

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Biologie
Studijní program: NEBR



Bc. Barbora Jelínková

Analýza lokalizace endomembránových markerů v kortikální vrstvě rostlinných buněk a
jejich interakce s komplexem Arp2/3

Analysis of endomembrane markers in the cortical cytoplasm and their co-localization
with Arp2/3 complex

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25. 7. 2019

Podpis

Poděkování

Děkuji své školitelce Katce Schwarzerové za četné konzultace, pomoc s experimenty a psaním práce, trpělivost a neustálou inspiraci.

Děkuji Lence Havelkové, Erice Bellinvia a Ayoubovi Stelate za pomoc s neposlušným vybavením a Mumínkovi za bezchybné hlídání běžících elektroforéz. Dále jsem vděčná všem členům laboratoří 203 a 002 za vytváření skvělé atmosféry.

Děkuji mamě, tátovi, babičce a dědovi, že mě vždy podporovali ve všem, pro co jsem se rozhodla.

A nakonec děkuji Ivanovi Loginovi za to, že mi byl během celého studia oporou a nedocenitelným rádčem.

Abstrakt

ARP2/3 je evolučně konzervovaný heterohemptamerický proteinový komplex. Jeho hlavní aktivitou je nukleace větvených aktinových vláken za účelem remodelace membrán. ARP2/3 se účastní remodelace plazmatické membrány a tvorby cytoplazmatických výběžků sloužících k pohybu u živočišných buněk a améboidních protist a účastní se exocytózy a endocytózy u živočichů a kvasinek. Cílem této práce bylo pokusit se najít souvislost komplexu ARP2/3 s regulací endomembránového systému u rostlin. Pomocí TIRF mikroskopie byla prozkoumána lokalizace komplexu ARP2/3 v kortikální vrstvě rostlinných buněk a porovnána s lokalizací endomembránových markerů ze skupiny Rab a exocytotickým markerem Exo84b. Podjednotky komplexu ARP2/3 lokalizovaly v blízkosti plazmatické membrány do dynamických teček nejvíce se podobajících lokalizaci Exo84b proteinu. Kolokalizační analýza ukázala malou míru kolokalizace signálu Exo84b a ARP2/3 a tento výsledek byl podpořen biochemickým přístupem koimunoprecipitace.

Klíčová slova: ARP2/3, endomembránový systém, kortikální vrstva, RabA1g, RabC1, RabD2a, Exo84b,

Abstract

ARP2/3 is an evolutionarily conserved heteroheptameric protein complex. Its main activity lies in the nucleation of dendritic actin filaments that are involved in membrane remodeling. ARP2/3 takes part in plasma membrane remodeling and the formation of cytoplasmic protrusions that serve in the amoeboid motion of mammalian cells and some protists and plays role in exocytosis and endocytosis of animal and yeast cells. The main objective of this work was to find a connection between the ARP2/3 complex and the regulation of the plant endomembrane system. Using TIRF microscopy we visualized the localization of the ARP2/3 complex in the cortical layer of plant cells and compared it to the localization of several endomembrane markers from the Rab family and an exocytotic marker Exo84b. In the vicinity of the plasma membrane, the ARP2/3 complex subunits localized to dynamic dots very similar to the localization of Exo84b protein. Colocalization analysis showed that a small portion of Exo84b marker and ARP2/3 complex signals colocalize and this result was seconded by the biochemical approach of coimmunoprecipitation.

Key words: ARP2/3, endomembrane system, cortical layer, RabA1g, RabC1, RaD2a, Exo84b

Obsah

1	Seznam zkratk.....	1
2	Úvod a cíle práce.....	3
3	Literární přehled.....	4
3.1	ARP2/3 proteinový komplex.....	4
3.1.1	Aktivační faktory komplexu ARP2/3.....	5
3.1.2	Funkce ARP2/3 u eukaryotických buněk.....	5
3.2	Interakce ARP2/3 a endomembrán.....	7
3.2.1	Živočišné buňky.....	8
3.2.2	Kvasinky.....	10
3.2.3	Jiné modely.....	12
3.2.4	Rostliny.....	13
3.3	Endomembránové proteiny.....	14
3.3.1	VHA-a1.....	15
3.3.2	FYVE.....	15
3.3.3	RAB GTPázy.....	16
3.3.4	Exo84b.....	18
4	Materiál a metody.....	21
4.1.1	Rostlinný materiál.....	21
4.1.2	Kultivace rostlin.....	22
4.1.3	<i>In vitro</i> kultivace.....	22
4.1.4	Křížení.....	22
4.1.5	Selekce.....	23
4.1.6	Mikroskopie.....	23
4.1.7	Obrazová analýza.....	24
4.1.8	Farmakologie.....	25
4.1.9	Izolace proteinů.....	25
4.1.10	Koimunoprecipitace.....	26
4.1.11	SDS-PAGE.....	26
4.1.12	Western Blot.....	28
4.1.13	ECL.....	29
5	Výsledky.....	30
5.1	Charakterizace vybraných markerových linií.....	30

5.2	ARP2/3	30
5.3	Endomembránové markery	32
5.3.1	FYVE	32
5.3.2	VHA-a1	34
5.3.3	RabA1g.....	35
5.3.4	RabC1.....	37
5.3.5	RabD2a.....	37
6	Interakce podjednotek ARP2/3 s endosomálními markery.....	39
6.1	Optická Kolokalizace podjednotek proteinového komplexu ARP2/3 s Rab proteiny ..	39
6.1.1	Interakce podjednotek ARP2/3 proteinového komplexu s Exo84b	40
6.2	Biochemický přístup	42
6.2.1	Koimunoprecipitace proteinového komplexu ARP2/3 s Rab proteiny	42
6.2.2	Koimunoprecipitace proteinového komplexu ARP2/3 s Exo84b	44
7	Diskuze.....	45
7.1	Lokalizace komplexu ARP2/3 v blízkosti PM	45
7.2	Mikroskopie endomembránových struktur.....	47
7.2.1	FYVE	47
7.2.2	VHA-a1	47
7.2.3	RabA1g.....	48
7.2.4	RabC1.....	48
7.2.5	RabD2a.....	48
7.2.6	Exo84b.....	49
7.3	Vizuální kolokalizace dvojitého linií.....	49
7.4	Biochemické potvrzení interakce.....	50
7.5	ARP2/3 interaguje s Exo84b	50
8	Závěry.....	52
9	Použitá literatura.....	53

1 SEZNAM ZKRATEK

Abp1 – Actin-binding protein 1

ARP2/3 – Actin related protein 2/3

BDM – 2,3- Butanedione monoxime

BFA – Brefeldin A

BRK1 – BRICK1

CESA – Cellulose synthase

COG – Conserved oligomeric Golgi

ConcA – Concanamycin A

COPII – Coat protein II

DMSO – dimethylsulfoxid

DRP – Dynamin-related protein

DT – dwelling time

ECL – Enhanced Chemiluminiscence

ECM – extracelulární matrix

EE – early endosome, časný endosom

EGTA - ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

EH – Epsin15-homology

Eps15 – Epsin15

ER – endoplazmatické retikulum

FABD – F-actin binding domain

FL – fluorescenčně (značený)

GA – Golgiho aparát

GAP – GTPase activating protein

GDI – GDP dissociation inhibitor

GEF – Guanine Exchange factor

GFP – Green fluorescent protein

HRP – Horseradish peroxidase

CHAPS - Chلامidopropyl-dimethyl-ammonio-1-propane sulfonate

LE – late endosome, pozdní endosom

LSCM – laser scanning confocal microscopy
LTC1 – Lipid transfer at contact sites 1
MES - 4-Morpholineethanesulfonic acid
mCh - mCherry
MVB - multivesicular body, multivesikulární tělísko
NAP1 – Nck-associated protein 1
NPF – Nucleation promoting factor
N-WASP – neurální-WASP
PAR-6 – partitioning defective 6
PIP – phosphatidylinositol phosphate
PM – plazmatická membrána
PTS1 – Peroxisome targeting signal
RE – recyklující endosom
RFP – Red fluorescent protein
SEC – Secretory mutant
SNARE – Snap receptor
SNX1 – Sorting nexin 1
SYP - Syntaxin
TGN – trans-golgi network, Trans-golgi síť
TIRFM – total internal reflection microscopy
TRAPP – Transport protein particle
Tris - tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRS85 - Trafficking protein particle complex III-specific subunit 85
VAMP – Vesicle associated membrane protein
VHA – V-type proton ATPase
WASP – Wiskott-Aldrich syndrome protein
SCAR/WAVE - Suppressor of cAR/WASP family verprolin-homologous protein
SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfát – polyacrylamide gel electrophoresis
WASH – WASP and SCAR homologue
WB – Western blot

2 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

ARP2/3 proteinový komplex je evolučně konzervovaný heteroheptamer jehož hlavní aktivitou je nukleace větvených aktinových vláken s typickým sklonem 70° (Amann and Pollard, 2001; Rouiller *et al.*, 2008). Aktin nukleovaný ARP2/3 se typicky účastní remodelace membrán. U kvasinek a živočišných buněk má doloženou roli v endocytóze závislé na klathrinu, kde napomáhá invaginaci vznikajícího endosomu (Galletta, Mooren and Cooper, 2010). Živočišné buňky využívají komplexu ARP2/3 pro nukleaci aktinu, který pomáhá fúzi sekretorických granulí s plazmatickou membránou v rámci exocytózy (Tran *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2020). Dále je u nich doložená interakce komplexu ARP2/3 s podjednotkami komplexu exocyst. Úloha ARP2/3 v regulaci endomembránových procesů u rostlin není dostatečně prozkoumána. Fenotypy mutantů v komplexu ARP2/3 jako jsou pokroucené trichomy, změna složení buněčné stěny a změněná morfologie vakuoly jeho roli v endomembránovém systému naznačují (Mathur *et al.*, 2003; Sahi *et al.*, 2018; García-González *et al.*, 2020)

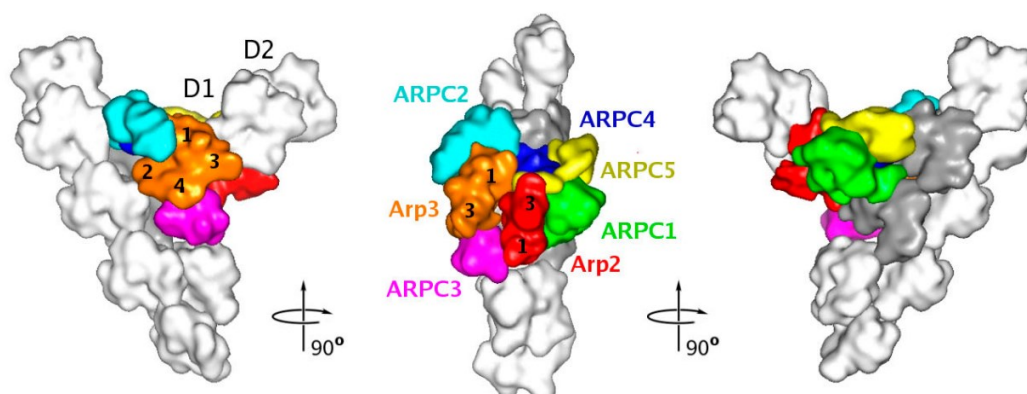
Cíle diplomové práce:

1. Analyzovat lokalizaci ARP2/3 pomocí TIRFM v kortikální vrstvě
2. Analyzovat lokalizaci endomembránových markerů pomocí TIRFM v kortikální cytoplazmě
3. Najít endomembránový marker, jehož lokalizace je podobná lokalizaci ARP2/3 a případnou interakci mezi nimi potvrdit pomocí dalších metod

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 ARP2/3 PROTEINOVÝ KOMPLEX

ARP2/3 (Actin Related Protein 2/3) je evolučně konzervovaný proteinový komplex zajišťující nukleaci dendritických aktinových vláken (Amann and Pollard, 2001). Skládá se ze 7 podjednotek ARP2, ARP3, ARPC1, ARPC2, ARPC3, ARPC4 a ARPC5 (Li *et al.*, 2003). Celý komplex nasedá na již existující aktinové filamentum, tzv. mateřské vlákno a následně nukleuje vznik nového. ARP2 a ARP3 jsou podjednotky tvořící funkční jádro komplexu a jsou svou strukturou velmi podobné aktinovému monomeru (Machesky *et al.*, 1994). Společně mimikují dvě aktinové podjednotky v F-aktinové konfiguraci, ke kterým jsou pak přidávány aktinové monomery a vzniká vlákno (Kelleher, Atkinson and Pollard, 1995). Zbylé podjednotky pak slouží k interakci s mateřským aktinovým filamentem. ARPC2 a ARPC4 podjednotky tvoří topologické jádro komplexu, kolem kterého se skládají ostatní (Kotchoni *et al.*, 2009) (Obr. 1).



Obrázek 1: 3D reprezentace ARP2/3 proteinového komplexu a jeho umístění na mateřském vlákně (Rouiller *et al.*, 2008).

Hlavní aktivita spočívá v nukleaci větvených aktinových vláken s typickým 70° sklonem na již existujícím, mateřském vlákně (Amann and Pollard, 2001; Rouiller *et al.*, 2008), ale jsou známy i případy nukleace lineárních aktinových vláken (Wagner *et al.*, 2013). Nukleační aktivita samotného komplexu je poměrně malá a je podporována jinými faktory podporujícími nukleaci (NPF, nucleation promoting factors).

3.1.1 AKTIVAČNÍ FAKTORY KOMPLEXU ARP2/3

Aktivační faktory komplexu ARP2/3 (či NPF) jsou skupinou funkčně a strukturně rozmanitých proteinů či proteinových komplexů zajišťujících aktivaci ARP2/3. Při navázání aktivátoru na komplex ARP2/3 dojde ke konformačním změnám, které způsobí, že podjednotky ARP2 a ARP3 zaujmou vůči sobě polohu připomínající postavení aktinu ve vláknech. To funguje jako jakési očko pro polymeraci nového aktinového vlákna. NPF napříč fylogenezí spojuje konzervovaná CA doména sloužící právě k vazbě ARP2/3 (Welch and Mullins, 2002). Aktivátorů ARP2/3 je celá řada, pokusím se ve zkratce představit dobře prozkoumané členy o kterých bude ještě řeč v dalších kapitolách (Kollmar, Lbik and Enge, 2012; Rotty, Wu and Bear, 2013)

U živočichů nalézáme aktivátory WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein), N-WASP (neurální WASP), SCAR/WAVE (suppressor of cAR/WASP family verprolin-homologous protein) a WASH (WASP and SCAR homologue). Mechanismem aktivace zde je kromě konformační změny komplexu ARP2/3 schopnost vázat G-aktin, čímž ho zprostředkují polymeraci závislé na ARP2/3 (Welch and Mullins, 2002).

Mezi kvasinkové aktivátory patří proteiny Las17 (kvasinkový homolog WASP), Pan1p (homolog živočišného klathrinového adaptoru Eps15 (Wendland *et al.*, 1996)), a dále Abp1 aktivátor, který na rozdíl od WASP homologních proteinů disponuje schopností vázat F-aktin namísto G-aktinu, čehož je nejspíš využíváno pro stabilizaci nově polymerovaného vlákna (Welch and Mullins, 2002). Více viz kapitola 3.2.2 SCAR/WAVE se u vůbec kvasinek nevyskytuje.

Rostliny využívají jediného aktivátoru - SCAR/WAVE komplexu, ostatní se nejspíš v rostlinné linii nedochovaly (Kollmar, Lbik and Enge, 2012).

3.1.2 FUNKCE ARP2/3 U EUKARYOTICKÝCH BUNĚK

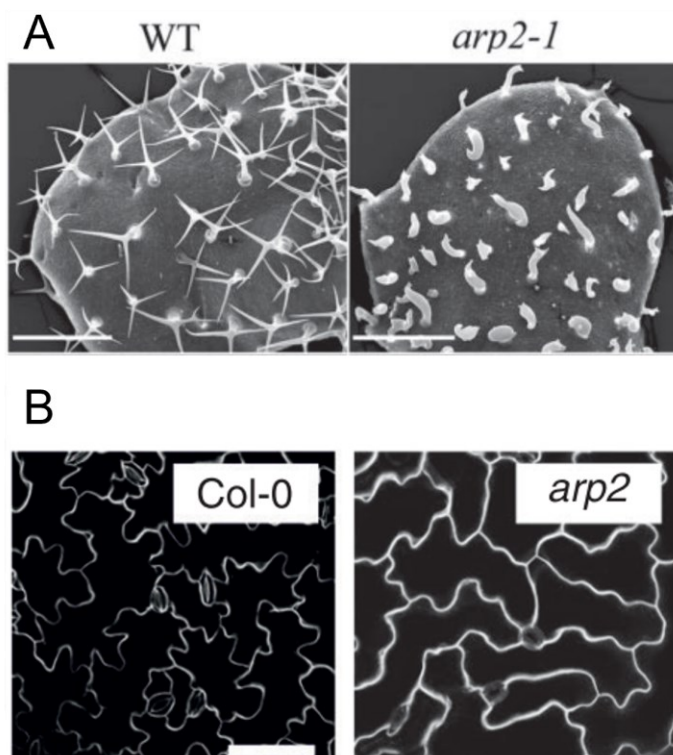
Aktivita komplexu ARP2/3 je vždy spojena s remodelací membrán pomocí aktinové nukleace. Tato funkce komplexu je výrazná u buněk vytvářejících cytoplazmatické výběžky a pohybujících se améboidním způsobem. Prodlužující se aktinová vlákna tlačí zevnitř na membránu a vznikají tak kónické protruze (Pollard and Borisy, 2003; Papalazarou and Machesky, 2021). Pro živočišné buňky je schopnost tohoto pohybu zásadní. V mnohobuněčném organismu má vyřazení komplexu ARP2/3 z funkce výrazný vliv na buňky migrující během vývoje, imunitní buňky, které se pro plnění své funkce potřebují přemísťovat, ale třeba také na rakovinné metastazující buňky (Semba *et al.*, 2006). Komplex ARP2/3 má vliv na schopnost migrace buněk u hádátka

(*Caenorhabditis elegans*). Snížení exprese komplexu pomocí RNA interference vedlo až k embryonální letalitě (Sawa *et al.*, 2003). U člověka vede mutace v aktivátoru WASP a deregulace aktivity komplexu ARP2/3 k defektní nukleaci aktinu u hematopoetických buněk. Jedná se o molekulární příčinu Wiskott-Aldrichova syndromu. Tato choroba vázaná na X chromosom se projevuje ekzémem, imunodeficiencí a trombocytopenií – poruchou krevní srážlivosti v důsledku snížení množství trombocytů v krvi (Zicha *et al.*, 1998; Thrasher, 2009). Kromě role komplexu v remodelaci plazmatické membrány (PM) spojené s buněčnou migrací je komplex ARP2/3 významný je i v regulaci endomembránového systému, což bude blíže popsáno níže (viz kapitola 3.2.1).

U jiného modelu – kvasinek, které mají pevnou buněčnou stěnu role v migraci odpadá. ARP2/3 vázané defekty u nich nejsou tak fatální jako mohou být u živočichů, ale například současné vyřazení Las17 a některé z podjednotek komplexu ARP2/3 je letální (Duncan *et al.*, 2001). Poměrně dobře je prozkoumána úloha kvasinkového komplexu ARP2/3 v endocytóze (viz kapitola 3.2.2).

3.1.2.1 FUNKCE ARP2/3 U ROSTLIN

Stejně jako kvasinky jsou rostlinné buňky obklopeny buněčnou stěnou a postrádají schopnost migrace. Mechanismus vlivu komplexu ARP2/3 v rostlinných buňkách stále není dostatečně objasněn. Nějakou roli nicméně komplex ARP2/3 v rostlinných buňkách mít musí, protože lze pozorovat zřetelné mutantní fenotypy (Obr. 2). Mezi nejnápadnější projevy patří deformované trichomy. Dále lze pozorovat zvýšení cirkularity dlaždicovitých epidermálních buněk děloh i časných pravých listů. Mutanti vykazují problémy s adhezí epidermálních buněk a změnu ve složení buněčné stěny (Mathur *et al.*, 2003; Deeks *et al.*, 2004; Sahi *et al.*, 2018). Velmi podobné fenotypy lze pozorovat u mutantů v podjednotkách SCAR/WAVE komplexu jako jsou NAP1 a BRK1 (Deeks *et al.*, 2004; Djakovic *et al.*, 2006).



Obrázek 2: fenotypy mutantů podjednotek komplexu ARP2/3. **(A)** Deformace trichomů (Li et al. 2003). **(B)** Zvýšená cirkularita dlaždicových buněk dělohy (Sahi et al., 2018).

Měřítka pro B = 500 μ m.

Měřítka pro C = 100 μ m.

3.2 INTERAKCE ARP2/3 A ENDOMEMBRÁN

Jak již bylo zmíněno výše, role proteinového komplexu ARP2/3 v organizaci a regulaci endomembránového systému vychází z jeho aktin-nukleární aktivity. Eukaryotická buňka je charakteristická komplexním endomembránovým systémem. Základními prvky jsou plazmatická membrána (PM), jaderná obálka, endoplazmatické retikulum (ER), Golgiho aparát (GA), trans-golgi síť (trans-golgi network, TGN), vakuola/lysosom a peroxisom. Důležitou strukturou je endosom, členěn na časný (EE, early endosome), recyklující (RE) a pozdní (LE, late endosome). Časně endosomy vznikají procesem endocytózy z PM, jejich dalším osudem pak může být recyklace zpět na PM průchodem přes recyklující endosom. Rostliny nemají specializovaný recyklační kompartment a jeho roli zastává TGN (Reyes, Buono and Otegui, 2011). TGN také tím pádem sdílí identitu s časným endosomem. Pozdní endosom je struktura vznikající maturací z časného. Má podobu multivesikulárního tělíska (multivesicular body, MVB), obsahujícího uvnitř další váčky vzniklé intraluminálním pučením. Pozdní endosom je pak většinou určen k degradaci v lysosomu či vakuole u rostlin. Zásadní dráhou v rámci endomembránového systému je sekretorická dráha. Typická sekrece zahrnuje

cestu z ER přes GA a TGN až na PM, kde dochází exocytóze. Pro funkci eukaryotické buňky je nezbytný proces autofagie, který úzce s endomembránovým systémem souvisí a který je v posledních letech podrobován intenzivnímu výzkumu. Autofagie je proces, při němž buňka degraduje a nezřídka poté recykluje větší či menší části svého vnitřního aparátu, často v reakci na hladovění nebo poškození. Činí tak za využití autofagosomu, specializovaného kompartmentu s dvojitou membránou (Lodish *et al.*, 2008; Wayne, 2009). Endomembránový systém je mnohem složitější než tento výčet struktur a drah. Mezi kompartmenty existují přechodné stavy a je známo množství alternativních drah používaných různými způsoby jen za určitých okolností.

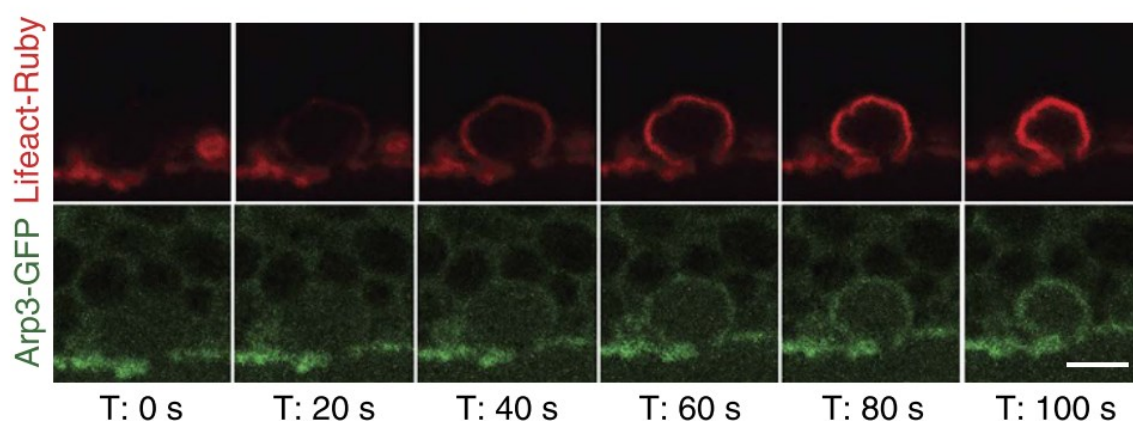
3.2.1 ŽIVOČIŠNÉ BUŇKY

U živočišných buněk je známa role komplexu ARP2/3 a jím nukleovaného aktinu v endocytóze závislé na klathrinu (Salisbury, Condeelis and Satir, 1980; Lamaze *et al.*, 1997; Fujimoto *et al.*, 2000). Oblast PM, kde vznikne endosom, je po rozeznání postupně osidlována plášťovými a adaptorovými proteiny, které rozeznávají náklad a zajišťují zakřivení membrány. Správná internalizace membrány je podstatná pro vznik váčku a závisí na časoprostorově přesné účasti mnoha proteinů. V místě zaškrcování váčku se objevuje ARP2/3 proteinový komplex spolu se svým aktivátorem N-WASP. Dává vzniknout aktinovým vláknům, která odstrkují vznikající endosom od PM a spolu s dalšími proteiny jako jsou dynaminy dojde k odškrcení (Merrifield *et al.*, 2004; Merrifield, Perrais and Zenisek, 2005; Kaksonen and Roux, 2018). Živočišná endocytóza závislá na klathrinu ale probíhá i bez účasti komplexu ARP2/3 (Mooren, Galletta and Cooper, 2012).

Jiné formy endocytózy jako fagocytóza, pinocytóza, či trogocytóza potřebují účast komplexu ARP2/3. Tyto úkony ovšem vycházejí z úlohy ARP2/3 ve vytváření panožek, které obklopí endocytovaný objekt (Mylvaganam, Freeman and Grinstein, 2021).

Pozoruhodná je úloha komplexu ARP2/3 v epiteliálních buňkách tenkého střeva myši. Absence ARPC3 podjednotky vedla ke postnatální letalitě v důsledku specifické deregulace váčkového transportu, možná související i s rolí komplexu ARP2/3 v sortingu endocytotického nákladu (Zhou, Sumigray and Lechler, 2015).

U živočišných buněk je výrazná role ARP2/3 komplexu v exocytóze. Velmi častým modelem jsou buňky s masivní sekrecí a velkými exocytotickými váčky, u kterých lze snadno pozorovat lokalizaci proteinů a průběh exocytózy.



Obrázek 3: lokalizace v čase FL značeného aktinu a ARP3 proteinu na sekreční granuli ve slinných žlázách octomilky (Tran *et al.*, 2015).

Měřítko = 5 μ m.

Jedním z takových případů jsou slinné žlázy larev octomilky (*Drosophila melanogaster*). F-aktin značený Lifeact markerem je přítomen na sekrečních váčcích v průběhu fúze, ale k vytvoření póru mezi váčkem a PM dochází ještě před detekcí F-aktinu. Při použití aktinových drog latrunkulinu A a cytochalasinu D byly sekreční váčky zvětšené, splývaly dohromady v cytoplazmě, docházelo stále k tvorbě póru, ale ne k úplné fúzi váčku s PM, někdy se váček s promíchaným obsahem znovu odpojil od PM a vrátil do cytoplazmy. ARP3 lze na váčcích po objevení se F-aktinu detekovat také (Obr. 3). Linie se s níženou expresí ARP2 a ARP3 pomocí RNA interference vykazovaly fenotyp podobný použití aktinových drog. Docházelo k vytváření póru mezi váčkem a PM, ale úplná fúze byla omezena. Vyřazení ARP2/3 aktivátoru WASP mělo podobný efekt jako vyřazení ARP2/3 podjednotek. Zdá se, že větvený aktin nukleovaný ARP2/3 by mohl být důležitý pro vypuzení váčku a jeho úplnou fúzi (Tran *et al.*, 2015)

Podobný jev byl zaznamenán u krysích β buněk sekretujících inzulin. K vytvoření póru také docházelo ještě před detekcí F-aktinu. Ošetření latrunkulinem způsobilo zmizení F-aktinového signálu a na rozdíl od předchozí studie se zvýšilo množství exocytotických událostí, které byly zároveň rychlejší. Autoři to vysvětlují sníženou stabilitou váčků a následnému kolapsu do PM, ale opačný efekt latrunkulinu oproti Tran *et al.*, 2015 nediskutují. Použití CK666 inhibitoru cílího na ARP2/3 vedlo ke snížení sekrece, váčky zůstávaly v blízkosti PM a fúze byla inhibována (Ma *et al.*, 2020).

Dalším projevem souvislosti ARP2/3 a endomembránové regulace jsou jeho interakce s endomembránovými proteiny. V savčích buňkách (HeLa a krysí ledvinové buňky) byla nalezena přímá interakce ARPC1 s Exo70, podjednotkou exocystu. Ukázalo se, že je tato interakce důležitá pro pohyblivost buněk a tvorbu filopodií (Zuo *et al.*, 2006). V navazující studii využívající buněčné kultury karcinomu prsu se objevuje další souvislost ARP2/3 – Exo70 interakce s exocytózou. Tyto buňky se po těle rozšiřují pomocí rozkladu okolní extracelulární matrix (ECM) a následným pohybem pomocí specializovaných panožek - invadopodií. ECM rozkládají metaloproteinázami, které sekretují a čím větší je míra této sekrece, tím větší je invazní potenciál buněk. Linie se sníženou expresí Exo70 měly i sníženou míru sekrece metaloproteináz. Dále je interakce Exo70 a ARP2/3 důležitá pro tvorbu invadopodií. Linie s větším invazním potenciálem měly oproti jiným zvýšenou míru interakce mezi ARP2/3 a Exo70 (Liu *et al.*, 2009). Podle všeho spočívá mechanismus působení Exo70 v podpoře nukleární aktivity ARP2/3. *In vitro* spolu s ARP2/3 aktivátorem WAVE zvyšoval nukleaci větvených vláken víc, než toho byl schopen samotný WAVE, tato aktivita byla závislá na interakci mezi Exo70 a ARP2/3 proteinu. Navíc přítomnost Exo70 pozitivně ovlivňovala interakci mezi ARP2/3 a WAVE proteinem (Liu *et al.*, 2012).

U háďatka (*Caenorhabditis elegans*) má ARP2/3 nejspíš roli v endocytóze a recyklaci proteinů na PM důležitých pro nastolení polarity buněk před dělením. U embryí háďatek s narušenou funkcí komplexu ARP2/3 pomocí RNA interference došlo ke změně ve struktuře kortikálního aktinu, zvětšení časných endosomů, změnám v jejich dynamice a agregaci PAR-6 proteinu v kortexu. Autoři navrhnou model, v němž by ARP2/3 figuroval v recyklaci endosomů (Shivas and Skop, 2012).

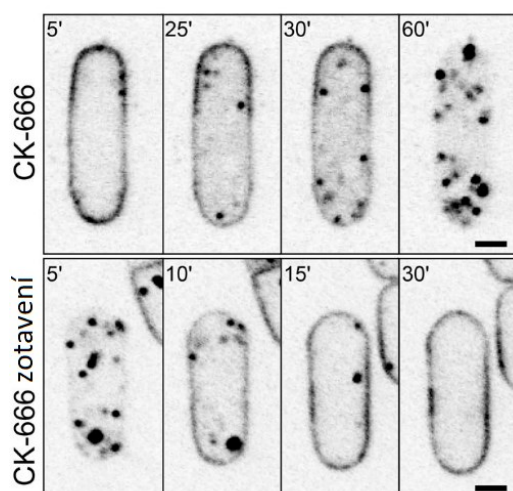
3.2.2 KVASINKY

Endocytóza u kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) je dobře prozkoumaným jevem a komplex ARP2/3 zde má významný vliv. Na rozdíl od živočišných buněk je přítomnost aktinu nukleovaného komplexem ARP2/3 pro kvasinky zásadní. Mutanti postrádající podjednotky komplexu mají endocytózu závislou na klathrinu problematickou (Moreau *et al.*, 1996, 1997; Cabrera *et al.*, 2011). Vysvětlením může být vyšší turgor kvasinkových buněk, který může znesnadňovat internalizaci membrán. Opravdu se ukázalo, že při snížení turgoru se u kvasinek zrychlil průběh časných fází endocytózy a také nižší turgor kompenzoval narušení aktinu toxinem latrunkulinem A (Basu, Munteanu and Chang, 2014).

Probíhající endocytózu lze identifikovat v místech aktinových ostrůvků (ang. actin patches) – typicky organizovaná aktinová vlákna v kortikální vrstvě cytoplazmy. Kortikální aktinový ostrůvek se z počátku vyskytuje na PM, později dochází k jeho internalizaci invaginací membrány, až je endocytotický váček úplně odštěpen od membrány (Goode, Eskin and Wendland, 2015). Totožně jako u živočichů endocytóza počíná rozeznáním nákladu na membráně obalovými a adaptorovými proteiny (Goode, Eskin and Wendland, 2015). Zároveň se na místě objevují aktivátory ARP2/3 – Las17, Pan1 a některé myosiny typu I (Galletta, Chuang and Cooper, 2008). Las17 je homologem savčího WASP, přímo interaguje s komplexem ARP2/3 a jeho mutace, podobně jako mutace podjednotek komplexu ARP2/3, se mimo jiné projevuje defektní endocytózou (Madania *et al.*, 1999). Vztah ARP2/3 a Las17 je ovšem o něco složitější, zvýšená exprese Las17 u některých ARP2/3 mutant zachraňovala fenotyp defektní endocytózy (Madania *et al.*, 1999), což může souviset s tím, že Las17 vykazuje aktin-nukleární aktivitu nezávislou na komplexu ARP2/3 (Robertson *et al.*, 2009). Pan1 protein má také ARP2/3 aktivační aktivitu (Duncan *et al.*, 2001), nejspíš podobné povahy jako je aktivita Las17, protože dvojitá mutace v Pan1 i Las17 měla kumulativní efekt (Toshima *et al.*, 2005).

Poté se na místě objevuje komplex ARP2/3 a začíná nukleovat aktinová vlákna, jak větvená (Young, Cooper and Bridgman, 2004), tak pomocí aktivátoru Dip1 i lineární (Basu and Chang, 2011; Wagner *et al.*, 2013; Balzer *et al.*, 2019). Tato aktinová vlákna vznikají po stranách a kolem postupně invaginující membrány, zde hraje roli další ARP2/3 aktivátor Abp1 (Goode *et al.*, 2001). Nejspíš prodlužováním aktinových vláken dochází k „odstrkování“ báze vznikajícího váčku až dojde k odškrcení za účasti několika dalších proteinů, např. dynaminu a uvolnění do cytoplazmy (Goode, Eskin and Wendland, 2015).

Komplex ARP2/3 má ale u kvasinek též funkce, které s endocytózou nesouvisejí. V loňské studii bylo ukázáno, že při použití CK666 inhibitoru, který specificky působí na komplex ARP2/3, došlo k reverzibilní akumulaci endosomů bohatých na sterol uvnitř buněk a ztrátě PM signálu. Tato internalizace nebyla ovlivněna narušením endocytózy ani sekrece. Vliv měla ovšem mutace v proteinu LTC1, který se vyskytuje v místech kontaktu PM a ER. Mechanismus tak možná tkví v účasti komplexu ARP2/3 na anterográdním transportu sterolů na PM a inhibice komplexu vede k zadržení sterolu na endosomech. Případně by mohla přítomnost ARP2/3 negativně regulovat retrográdní přenos sterolů z PM na endosomy pomocí LTC1 (Marek, Vincenzetti and Martin, 2020), (Obr. 4).



Obrázek 4: vratná akumulace na sterol bohatých endosomů uvnitř buňky kvasinky v důsledku ošetření ARP2/3 inhibítozem CK666 (Marek, Vincenzetti and Martin, 2020). Měřítka = 2 μ m.

U dalších houbových zástupců lze také nalézt souvislosti endomembrán a komplexu ARP2/3. *Aspergillus niger* má při snížené expresi ARP2/3 aktivátoru WASpA (ortologu kvasinkového Las17) sníženou míru endocytózy (Hoshi *et al.*, 2016). U *Candida albicans* mutace podjednotky ARPC1 způsobilo defekty ve schopnosti vytvářet biofilmy, která byla důsledkem změny složení a integrity buněčné stěny. Též došlo k navýšení míry endocytózy, pravděpodobně v důsledku kompenzačních mechanismů (Lee *et al.*, 2016).

3.2.3 JINÉ MODELÝ

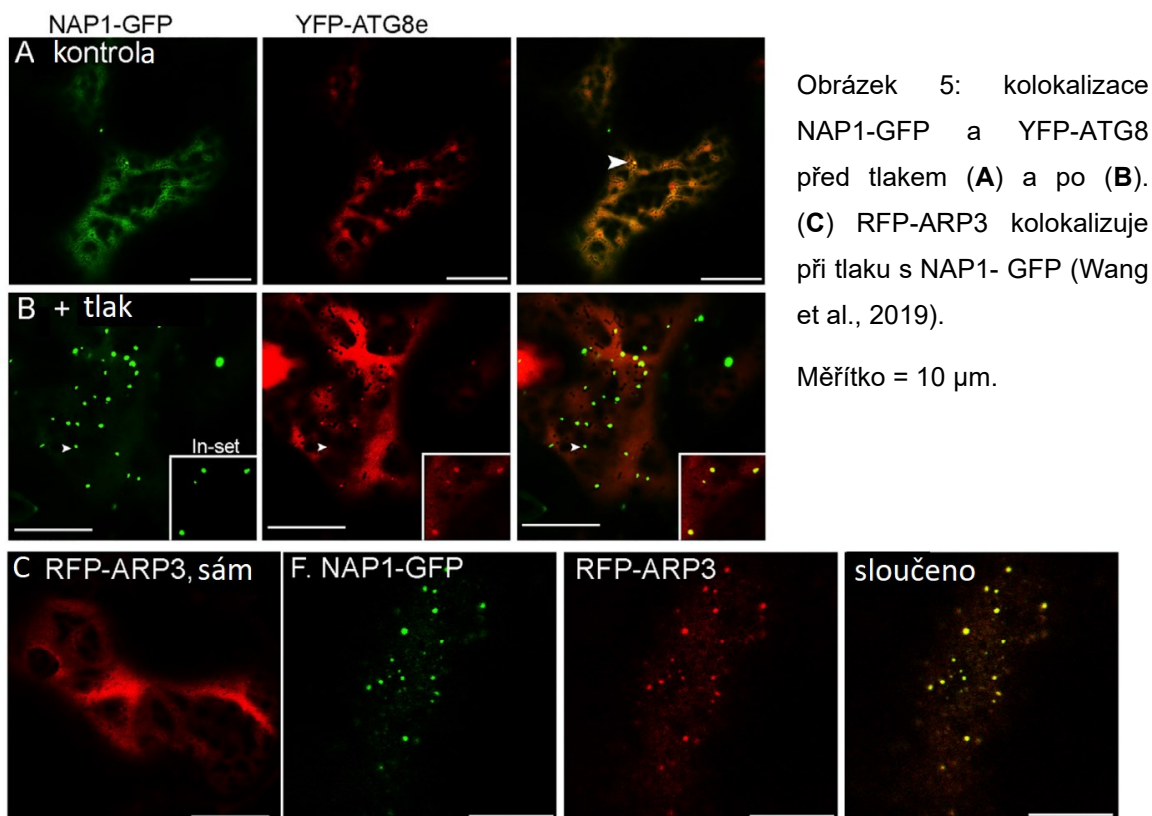
U hlenky *Dictyostelium* byl ARP2/3 komplex pozorován v souvislosti s fagocytózou a amébovým pohybem. Signál ARP2/3 se objevoval na PM v místě fagocytované částice, později z fagosomu komplex ARP2/3 disocioval v závislosti na pH fagosomu (Insall *et al.*, 2001). Na stejném modelu byl později ukázán vliv aktivátoru WASH na exocytózu nestráveného materiálu a co víc – aktinem zajištěný sorting. V tomto případě WASH aktivoval nukleaci aktinu na lysosomech, který zajišťoval odstranění V-ATPázy z povrchu lysosomu. Poté mohlo dojít k neutralizaci obsahu lysosomu a exocytóze (Carnell *et al.*, 2011).

Jako součást specializované endocytózy, v tomto případě trogocytózy, je komplex ARP2/3 popsán u prvoka *Entamoeba histolytica*. ARP2/3 je do míst trogocytózy rekrutován pomocí SNX1 (sorting nexin 1) proteinu, který zde rozeznává na PI3P obohacenou membránu (Watanabe, Nakada-Tsukui and Nozaki, 2020).

3.2.4 ROSTLINY

Existují náznaky úlohy komplexu ARP2/3 v endocytóze závislé na klathrinu a to ve formě interakcí mezi komplexem ARP2/3 a adaptorovým komplexem TPLATE u rostlin. TPLATE komplex rozeznává endocytotický náklad, interaguje s klathrinem a je zodpovědný za sestavení klathrinového skeletu endocytotického váčku (Gadeyne *et al.*, 2014). Podjednotky TPLATE komplexu AtEH1/Pan1 a AtEH2/Pan1, které jsou homologní s kvasinkovým Pan1p (viz výše), přímo interagují s F-aktinem i s komplexem ARP2/3 (Wang *et al.*, 2019). Tato myšlenka je ale v rozporu s nedávnou studií, která ukazuje, že rostliny pro endocytózu závislou na klathrinu aktin nepotřebují (Narasimhan *et al.*, 2020). Snímání oblastí membrány osídlených klathrinem elektronovou mikroskopií ukazuje, že navzdory předpokladům v těchto místech aktin není nijak nabohacen. Aktin navíc není potřebný pro správný průběh endocytózy, jak ukázalo ošetření aktinovými disruptory. V čem nastala po ošetření změna, byla následná doprava endosomu k TGN kompartmentu, a aktin by tak mohl být důležitý pro pozdější fáze existence časného endosomu (Narasimhan *et al.*, 2020).

Ukazuje se, že ARP2/3 a jeho regulátory mají funkci v autofagii a vzniku autofagosomu. Právě AtEH/Pan1 kolokalizuje s ATG8 (autofagy related protein 8), autofagickým markerem. Signál AtEH/Pan1 je v místech kontaktu ER a PM membrán, a nejspíš zde dává vzniknout autofagosomům za účasti komplexu ARP2/3 (Wang *et al.*, 2019). Protein NAP1 při působení vnějšího tlaku na buňku lokalizuje do teček, které také kolokalizují s ATG8 markerem a jedná se tudíž o autofagosomy. Zároveň s NAP1 pozitivními autofagosomy kolokalizuje ARP3 a SCAR2 (Wang *et al.*, 2016), (Obr.5).



Komplex ARP2/3 má vliv na morfologii vakuoly. Mutace způsobila fragmentaci centrální vakuoly dlaždicových buněk (García-González *et al.*, 2020). Podobně u svěracích buněk ARP2/3 mutantů nedocházelo k fúzi vakuol při otevírání průduchů (Li *et al.*, 2013).

Protože většina složek buněčné stěny je dopravována na své místo sekretorickou drahou, další nepřímou indicií úlohy ARP2/3 v endomembránovém systému je změna složení a defekty buněčné stěny u mutantů. Analýza složení buněčné stěny mutantů ukázala, že mají větší poměr celulóza/hemicelulóza a zvýšený podíl homogalakturonanů ve stěně. Také jsou zaznamenány změny v lignifikaci vodivých elementů, které ovšem mohou být důsledek kompenzace (Sahi *et al.*, 2018).

3.3 ENDOMEMBRÁNOVÉ PROTEINY

V následujících kapitolách přiblížím známé charakteristiky proteinů souvisejících s endomembránami, které jsem pro práci využila.

3.3.1 VHA-A1

VHA-a1 je podjednotka protonové pumpy vakuolárního typu (VHA). VHA se jakožto multiheteromerní komplex skládá z cytosolického subkomplexu V1 (podjednotky A, B, C, D, E, F, G) a membránového subkomplexu V0 (podjednotky a, d, e c, c', c'') (Dietz *et al.*, 2001; Sze *et al.*, 2002).

Aktivita VHA spočívá v pumpování protonů do lumen příslušného endomembránového kompartmentu (Rea and Sanders, 1987), zvýšené pH v kompartmentu mění interakci a aktivitu proteinů v něm (Matsuoka *et al.*, 1997), ale protonový gradient je především využíván proteiny zajišťujícími sekundární transport přes membránu. Navzdory názvu, který vychází z původního objevu komplexu (Rea and Sanders, 1987), se VHA vyskytuje i na membránách jiných kompartmentů (Herman *et al.*, 1994)

Fluorescenčně značená VHA-a1 je velmi často využívána jako TGN/EE marker (Viotti *et al.*, 2010; Hutten *et al.*, 2017; Shimizu *et al.*, 2021). Lokalizace v TGN je podpořena výsledky ze studie Dettmer *et al.*, z roku 2006. VHA-a1-GFP lokalizovala při ošetření BFA do BFA tělísek, typických pro TGN/EE, dále kolokalizovala s již charakterizovaným TGN markerem SYP41-mRFP. Výsledek kolokalizace v živých buňkách je dále podpořen elektronovou mikroskopií, kde pomocí kryo-elektronové mikroskopie a imunozařování protilátkami se zlatými partikulami protilátka značily oblasti v blízkosti TGN cisteren. Na endosomální lokalizaci VHA-a1-GFP ukazuje kolokalizace s endocytovanou FM4-64 fluorescenční barvou. VHA-a1-GFP pozitivní endosomy jsou odlišné od populace endosomů značených dříve charakterizovaným ARA7-GFP (RabF2b) markerem, neboť VHA-a1-GFP a ARA7-mRFP kolokalizovaly velmi málo. Experimenty s ošetřením ConCA, který inhibuje aktivitu V-ATPáz, ukázaly blokadu přenosu FM4-64 na tonoplast a tudíž narušení endosomálního transportu. Došlo ke změně morfologie GA a TGN a objevení se zvětšených váčků TGN původu v jeho okolí (Dettmer *et al.*, 2006).

Letošní studie využívající super-resoluční konfokální mikroskopii dále ukazuje, že VHA-a1 lokalizuje do diskrétních částí TGN než jiné TGN markery, ukazující na odlišnou funkci markerů jednoho kompartmentu (Shimizu *et al.*, 2021).

3.3.2 FYVE

FYVE je evolučně konzervovaná proteinová doména, její název vychází ze 4 proteinů, u kterých byla zaznamenána: Fab1, YOTB/ZK632.12, Vac1 a EEA1 (Stenmark *et al.*, 1996). Strukturně tato doména patří mezi tzv. zinkové prsty (Stenmark *et al.*, 1996)

a velmi specificky rozeznává PI(3)P (phosphatidylinositol 3 phosphate) (Jensen *et al.*, 2001). FYVE doména u rostlinných buněk značí pozdní endosomální a prevakuolární vaky a tonoplast (Vermeer *et al.*, 2006).

3.3.3 RAB GTPÁZY

Rab GTPázy (Ras-related brain GTPase) patří do evolučně konzervované rodiny malých GTPáz (Rutherford and Moore, 2002). Cyklování mezi aktivním a neaktivním stavem jim propůjčuje funkci molekulárního spínače. Aktivace je zprostředkována GEF proteiny (Guanine nucleotide Exchange Factor), které katalyzují výměnu GDP za GTP (Jones *et al.*, 1995), která má za následek odhalení isoprenylové kotvy na C-konci způsobené konformační změnou, čímž se z Rab GTPázy stává periferní membránový protein připravený interagovat s Rab efektory (Araki *et al.*, 1990). Při inaktivaci GAP (GTPase Activating Protein) proteiny katalyzují GTPázovou aktivitu Rab proteinu (Strom *et al.*, 1993), kdy je GTP hydrolyzováno na GDP + Pi a zároveň následná změna konformace a navázání GDI (GDP-dissociation inhibitor) způsobí skrytí isoprenylové kotvy a uvolnění Rab-GTPázy do cytoplazmy (Araki *et al.*, 1990; Regazzi *et al.*, 1992; Ullrich *et al.*, 1993; Soldati *et al.*, 1994).

Rodiny u různých organismů typicky čítají mnoho členů (např: *S. cerevisiae* – 11, *C. elegans* – 29, *H. Sapiens* – 60, *A. thaliana* – 57) (Pereira-Leal and Seabra, 2001). Jednotliví členové rozmanitě a specificky osidlují různé části endomembránového systému (Rutherford and Moore, 2002). Na svém místě pak interagují s dalšími proteiny (Rab efektory) jako jsou např. receptory, obalové proteiny, molekulárními motory, poutací komplexy, čímž se účastní všech dějů endomembránového transportu: specifického nakládání včků, pučení včků na donorové membráně, transportu, přibližování a fúze včku s cílovou membránou (Rutherford and Moore, 2002; Stenmark, 2009; Heard *et al.*, 2015).

Rostlinné Rab proteiny jsou specifické velmi početnou RabA skupinou; u *A. thaliana* čítá 26 členů (Rutherford and Moore, 2002). Další rostlinnou specialitou je RabF skupina, která má namísto isoprenylové kotvy umístěné na C-konci místa pro myristoylaci, nebo na N-konci místa pro palmitoylaci (Ueda *et al.*, 2001). V této práci byly použity jako marker některé proteiny z této rodiny.

3.3.3.1 *RAB1G*

Jedná se o protein z početné RabA skupiny. Jen RabA1 proteinů je celkem 9 (RabA1a-i) (Rutherford and Moore, 2002). Studie z roku 2009 zabývající se tvorbou a charakterizací endosomálních markerů uvádí, že RabA1g je velmi citlivý k BFA, částečně kolokalizuje s FM4-64 a nejspíš je tak markerem recyklujících/časných endosomů (Geldner *et al.*, 2009). RabA1g-positivní endosomy také nejspíš interagují s ER, neboť byla zjištěna kolokalizace s ER markery a při narušení struktury ER došlo k snížení rychlosti pohybujících se endosomů (Stefano *et al.*, 2015). Exprese proteinu probíhá hlavně v květech, ale částečně také ve vegetativních orgánech (Asaoka *et al.*, 2013). V synergidách má RabA1g poměrně difuzní signál, ale endosomální značení je stále patrné (Jones *et al.*, 2018).

3.3.3.2 *RAB1C*

RabC1 je jediný ve své skupině. Již zmiňovaná studie z roku 2009 ukazuje střední citlivost markeru k BFA, částečnou kolokalizaci s FM4-64 a nabízí post-Golgi/endosomální lokalizaci (Geldner *et al.*, 2009). Lokalizace RabC1 je citlivá k obsahu sterolu v membránách – v mutantě *dry2/sqe1* (*drought hypersensitive/squalene epoxidase*), která má snížené množství některých sterolů v membránách, došlo ke změně distribuce signálu RabC1-YFP a tonoplastového markeru RabG3f-YFP, (Sena *et al.*, 2017).

U karafiátu byla zjištěna zvýšená přítomnost tohoto proteinu u stonků vykazujících hypohydricitu za nízkého obsahu Si v růstovém mediu. Při dodání Si se množství proteinu naopak snižovalo (Muneer *et al.*, 2018).

3.3.3.3 *RABD2A*

RabD2a patří do skupiny tří RabD2 paralogů nalezených v genomu *Arabidopsis thaliana* (Rutherford and Moore, 2002). Vykazuje střední citlivost k BFA, částečnou kolokalizaci s FM4-64 a jeho lokalizace je poměrně široká, uvádí se Golgi/endosom (Geldner *et al.*, 2009). Bližší pohled na reakce markeru při BFA ošetření ukazuje, že je signál akumulován i v nitru BFA tělísek, což ukazuje na TGN/EE lokalizaci, která je podpořena kolokalizací s TGN/EE markerem VHA-a1 (Pinheiro *et al.*, 2009).

Při expresi dominantně mutantního proteinu, ve kterém byl vyměněn Asn 121 za Ile a který nepřechází do aktivního stavu, se ukázalo, že RabD2a má vliv na ER export

a na pohyb GA (Batoko *et al.*, 2000). V navazující studii tato mutanta po BFA ošetření potlačovala návrat Golgi do původního stavu, ale zároveň neovlivňovala retrográdní transport do ER (Saint-Jore *et al.*, 2002).

Je známo několik RabD2a interaktorů. V pull-down analýzách byl identifikován SNARE protein SYP61, který se podílí na dopravě proteinů syntézy buněčné stěny a resistance k chorobám k PM (Drakakaki *et al.*, 2012). Přímou pull-down RabD2a proteinu ukázal interakce např. s proteiny sekretorické dráhy (SEC8, SEC10); proteiny důležitými pro odštěpení váčku od membrány (DRP3a), přiblížení váčku k cílové membráně a fúzi (TRS85, VAMP722), a proteiny asociovaným s TGN (COG1, COG8). Koimunoprecipitace neprokázala interakci s VHA-a1 (se kterým byla dříve ukázaná kolokalizace signálu (Pinheiro *et al.*, 2009)) ani se SYP61 (Heard *et al.*, 2015).

Jako GEF proteinu RabD2a byl identifikován protein TRS85. Mutageneze tohoto proteinu měnila lokalizaci RabD2a v buňkách klidového centra: u mutanty byl signál disperzní, zatímco u WT byly pozorovatelné tečkovité kompartmenty v cytoplazmě (Song *et al.*, 2020). Tento protein byl identifikován v pull-down experimentech jako interaktor SYP61 (Drakakaki *et al.*, 2012) i RabD2a (Heard *et al.*, 2015).

3.3.4 EXO84B

Exo84b je podjednotka komplexu exocyst poutajícího sekretorické váčky k PM (TerBush *et al.*, 1996; Guo, Grant and Novick, 1999; Hála *et al.*, 2008; Fendrych *et al.*, 2010). Exocyst se skládá z celkem dvou subkomplexů. Jeden subkomplex je tvořen proteiny SEC3, SEC5, SEC6, SEC8 a druhý SEC10, SEC15, EXO70 a EXO84 (Heider *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2018). Komplex je dobře prozkoumán na kvasinkovém, živočišném i rostlinném modelu a je evolučně velmi konzervativní (Koumandou *et al.*, 2007). Poutací komplex exocyst zajišťuje specifickou lokalizaci váčku na membráně, kde dojde k fúzi váčku a membrány. K zabezpečení správného místa a času musí být sestavování proteinového komplexu regulováno. Dosud není přesně objasněna dynamika podjednotek a subkomplexů během tohoto sestavování. Ví se, že k připojení k PM slouží podjednotky Exo70 a SEC3, které mají domény vázající PI(4,5)P2 (Wu and Guo, 2015; Kubátová *et al.*, 2019) a vazbu na váček například u kvasinek a živočichů zprostředkovává SEC15 podjednotka interakcí s Rab proteiny vázanými na membránu váčku (Guo *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2005). Jedna z hypotéz říká, že Exo70 a SEC3 lokalizují na PM a zbytek komplexu je vázán na membránu sekretorického váčku a při setkání se podjednotek a kompletaci komplexu dojde i k přiblížení váčku

k PM, jak to bylo předvedeno u pučících kvasinek (*S. cerevisiae*) (Boyd *et al.*, 2004). U kvasinek, které se dělí příčným dělením (*S. pombe*) a savců Exo70 a SEC3 lokalizovaly i na sekretorickém váčku se zbytkem komplexu (Wu and Guo, 2015). U rostlin pak byly podjednotky Exo84b, SEC6 a SEC8 lokalizovány na PM aniž by poutaly váček, což by ukazovalo na variantu, že je exocyst již předpřipravený na PM (Fendrych *et al.*, 2013). Jak přesně a v jakých případech zajišťují podjednotky exocystu poutání váčku k PM tedy ještě není uspokojivě zodpovězeno.

Rostlinný exocyst se oproti komplexům ostatních eukaryotických modelů vyznačuje velmi početnou Exo70 skupinou. Živočichové i kvasinky mají gen pro Exo70 pouze v jediné kopii, rostlinná Exo70 skupina obsahuje 9 podskupin (A-J), přičemž i ty obsahují několik členů (Eliáš *et al.*, 2003; Žárský *et al.*, 2020). Jejich variabilita odráží množství funkcí, které jsou pro exocyst u rostlin doloženy. Exo70A1 je považován za údržbový (housekeeping), neboť je exprimován víceméně stabilně napříč pletivy. Jmenovitě se účastí například cytokineze či depozice složek sekundární buněčné stěny. Další proteiny rodiny EXO70 mají specializované úlohy např. v pylové láčce (Exo70A2), imunitní odpovědi (Exo70B1, B2), autofagii a s ní spojenou sekrecí (Exo70B1, E2) (Žárský *et al.*, 2020). Exocyst dále může interagovat se SNARE proteiny a účastnit se tak i pozdějších fází sekrece (Pečenkova *et al.*, 2011).

Exo84b lokalizace má při využití TIRF mikroskopie formu teček na PM. Tečky s omezeným laterálním pohybem a průměrným časem, který na membráně strávily až 10 s připomínaly lokalizaci a dynamiku proteinů TPLATE a DRP1C, které se na PM účastní endocytózy (Gadeyne *et al.*, 2014). Tečkovitou lokalizaci měly i další podjednotky exocystu a kolokalizovaly s tečkami Exo84b, což naznačuje, že by tečky mohly být místem exocytotických událostí. Teček bylo ale značně více, než váčků v blízkosti PM pozorovaných elektronovou mikroskopií. Jak je zmíněno výše, je možné, že je komplex na PM předpřipraven pro exocytózu. To, že jsou tečky opravdu na membráně i bez sekretovaného váčku, je dokázáno necitlivostí teček k BFA. Tečky jsou naopak citlivé k narušení aktinu, ačkoli s ním nekolokalizovaly (Fendrych *et al.*, 2013).

Exo84b knock-out mutace se projevuje zakrslostí a sterilitou rostlin. Trichomy mutantních rostlinek byly deformované, či úplně chybějící. Dlaždicové epidermální buňky listů byly oproti kontrole méně laločnaté, byly u nich často pozorovány aberantní výběžky buněčné stěny procházející téměř napříč celou buňkou. Mutace měly vliv i na morfologii průduchů. V buňkách byla dále pozorována akumulace váčků obsahujících vláknité struktury – nejspíš pektiny a xyloglukany dopravované k PM. Fenotyp je

způsoben úlohou proteinu v cytokinezi a sekreci (Fendrych *et al.*, 2010). Bylo zjištěno, že *exo84b* má problémy s proto/metaxylémem. U mutantu docházelo k častému borcení protoxylémových elementů v důsledku aberantního ukládání sekundární buněčné stěny. FL značené podjednotky exocystu byly lokalizovány do míst sekundárních ztloustnutí a byla ukázána změněná lokalizace CESA u *exo* mutant (Vukašinović *et al.*, 2017).

4 MATERIÁL A METODY

4.1.1 ROSTLINNÝ MATERIÁL

Pro práci bylo využíváno linií rostlin *Arabidopsis thaliana*, s fluorescenčně značenými proteiny Tab. 1)

Tabulka 1: seznam linií s fluorescenčně značenými proteiny.						
označení	protein	značí	FL	vektor	Zdroj/autor	číslo v lab databázi
GFP- <i>AtARPC2</i>	<i>AtARPC2</i>	ARP2/3	GFP	pGreen	Jan Martinek Havelková et al. 2015	F031
iGFP- <i>NtARPC2</i>	<i>NtARPC2</i>	ARP2/3	GFP	pER8	Kateřina Šlajcherová, 2013	F010
GFP- <i>AtARPC5</i>	<i>AtARPC5</i>	ARP2/3	GFP	pGreen II	Jan Martinek, nepublikováno	F014
<i>AtARPC5</i> - mCh	<i>AtARPC5</i>	ARP2/3	mCh	pGreen	Jan Martinek, nepublikováno	F057
PX-RFP	PTS1	peroxisom	mCh	pBin20	Nelson et al., 2007	F023
RFP-GA	(49aa)GmMan1	GA	mCh	pBin20	Nelson et al., 2007	F017
GFP- FABD	FABD	aktin	GFP	pCB302	Voigt et al., 2005	F006
Exo84b- RFP	Exo84b	Exocyst	RFP	pK7RWG2	Fendrych et al. 2013	FM058
GFP- FYVE	FYVE	pozdní endosom, tonoplast	GFP	NA	Nespecifikováno; databáze laboratoře buněčné morfogeneze, KEBR	-
VHA-a1- GFP	VHA-a1	TGN	GFP	pGTkan	Dettmer et al., 2006	-
mCh- RabA1g	RabA1g	recyklující endosom	mCh	NIGEL15/17	Geldner et al., 2009	F073
mCh- RabC1	RabC1	post-Golgi váčky	mCh	NIGEL15/17	Geldner et al., 2009	F072
mCh- RabD2a	RabD2a	TGN/EE	mCh	NIGEL15/17	Geldner et al., 2009	F074
35S::GFP	GFP	-	GFP	NA		F016
35S::GFP	GFP	-	GFP	NA	laboratoř buněčné morfogeneze, KEBR, Eva Kollárová	F065
XVE-GFP	GFP	-	GFP	pER8	Bokvaj, 2012, DP	F062

4.1.2 KULTIVACE ROSTLIN

Kultivace probíhala v kultivační místnosti za teploty 23 °C, při fotoperiodě 16 hodin – světlo, 8 hodin - tma, zálévání probíhalo přibližně každé 3 dny. Rostliny rostly jednotlivě zasazené v rašelinových tabletách jiffy, průměr 41 mm (<http://www.jiffypot.com>), které byly hydratovány ve vodě s rozpuštěným hnojivem Krystalon o koncentraci 1 g/l. Linie s fluorescenčně značenými proteiny byly nejprve pěstovány *in vitro*, po zhruba týdnu selektovány na expresi markeru a pak byly semenáčky přeneseny do jiffy, které byly první 2 dny zavřeny v průhledné krabici, či překryté potravinovou fólií a následně v průběhu 3 dnů postupně odkrývány, aby si rostliny zvykly na kultivaci s nižší vzdušnou vlhkostí. V některých případech byly rostliny později přeneseny do arasystému ([ww.arasystem.com](http://www.arasystem.com)).

4.1.3 IN VITRO KULTIVACE

Semena byla sterilizována v 1,5ml mikrozkuhavce 30 sekundovým působením 95% EtOH, který byl poté odpipetován. Následovalo 10 minut třepání semen v 50% roztoku bělidla SAVO. V laminárním boxu bylo SAVO odpipetováno a semena byla 4x propláchnuta ultra čistou destilovanou vodou. Semena pak podstoupila několika denní stratifikaci při 4 °C. Potom byla rovnoměrně naseta na minimální kultivační medium (Tab. 2) v plastové Petriho misce. Následně byly tyto misky zalepeny chirurgickou samolepící páskou a přeneseny do kultivační místnosti, kde byla teplota 23 °C, fotoperioda 16 hodin světlo, 8 hodin tma.

Tabulka 2: minimální MS medium pro <i>Arabidopsis thaliana</i> , 1L media.	
MS soli (Merck, M5524)	2,2 g
Sacharóza	10 g
Agar (Duchefa Biochemie, P1001)	8 g
pH (KOH)	5,7

4.1.4 KŘÍŽENÍ

Pro křížení bylo třeba na mateřské rostlině vybrat vhodné květenství, ze kterého byly odstraněny všechny případné šešule, odkvetlé či již otevřené květy. Pod stereoskopickým mikroskopem pak byl odstraněn i vrchol květenství s nejmladšími květy, následně byly vybrány 2-4 vhodné květy, které ještě neměly prasklé prašníky, ale již měly receptivní bliznu a z těchto byly hodinářskou pinzetou odtrhány kališní

a korunní lístky a prašníky. Z otcovské rostliny byl odtržen otevřený květ, či pouze prasklý prašík a odhalená blizna mateřské rostliny jím byla opylena.

Kříženy byly vytvářeny dvojité linie fluorescenčních markerů, seznam vytvořených linií viz Tab. 3.

Tabulka 3 : dvojité linie.		
označení	rodičovské linie	číslo v lab databázi
GFP-AtARPC2/mCh-RabA1g	F031, F073	F077
GFP-AtARPC2/mCh-RabC1	F031, F072	F076
GFP-AtARPC2/mCh-RabD2a	F031, F074	F078
iGFP-NtARPC2/mCh-RabA1g	F010, F073	F080
iGFP-NtARPC2/mCh-RabC1	F010, F072	F079
iGFP-NtARPC2/mCh-RabD2a	F010, F074	F081
GFP-AtARPC5/mCh-RabA1g	F014, F073	F082
GFP-AtARPC5/mCh-RabC1	F014, F072	F083
GFP-AtARPC5/mCh-RabD2a	F014, F074	F084
iGFP-NtARPC2/Exo84b-RFP	F010, FM058	FM076
GFP-AtARPC5/Exo84b-RFP	F014, FM058	FM075
GFP-FYVE/RFP-GA	F017, GFP-FYVE	-
GFP-FYVE/PX-RFP	F023, GFP-FYVE	-
GFP-AtARPC2/AtARPC5-mCh	F031, F057	FM026
35s::GFP/Exo84b-RFP	F064, FM058	F075

4.1.5 SELEKCE

Rostliny byly kultivovány *in vitro* a byly selektovány přibližně 7 dní po nasetí. Fluorescenční linie byly selektovány pomocí mikroskopu Olympus Provis AX 70. Vybrané rostliny byly dále pěstovány v rašelinových peletách jiffy.

4.1.6 MIKROSKOPIE

Pro mikroskopii byly použity 5-denní semenáčky. TIRF mikroskopie probíhala na mikroskopu Elyra PS.1, kamerou sCMOS PCO Edge 5.5. Ze semenáček byly nůžkami či skalpelem odstraněny dělohy kvůli dobrému kontaktu buněk hypokotylu se sklíčkem a pak byly přeneseny do kapky média na podložním sklíčku a překryty „high precision“ (Marienfield, 630-2186) krycím sklíčkem. Pozorovány byly pomocí objektivu alpha PlanApo (100x, NA = 1,46, WD = 0,11 mm, olejová imerze). GFP značené proteiny byly excitovány diodovým laserem o vlnové délce 488 nm a pro snímání byl použit filtr MBS 488 + EF BP 495-550 / LP 750. RFP a mCh značené proteiny byly excitovány DPSS laserem o vlnové délce 561 nm, zde byl použit filtr MBS 561 + EF BP 570-620 /

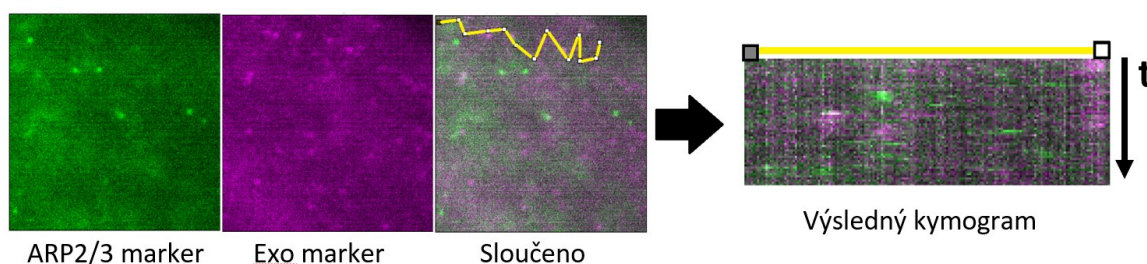
LP 750. Při snímání dvojitých linií byly fluorofory excitovány stejnými lasery a byl použit filtr Tripleband Set DAPI/FITC/TRITC FSet77 HE.

Laserová konfokální skenovací mikroskopie probíhala na mikroskopu Carl Zeiss LSM 880 NLO, za použití objektivu C-Apochromat (63x, NA = 1,2, WD = 0,28 mm, vodní imerze). GFP bylo excitováno argonovým laserem o vlnové délce 488 nm, RFP a mCh laserem o vlnové délce 561 nm. Bylo použito filtru MBS 488/561.

Snímky byly zpracovávány v softwaru ZEN blue 3.1.

4.1.7 OBRAZOVÁ ANALÝZA

Pro zjišťování kolokalizace u dvojité linie Exo84b-RFP/iGFP-*Nt*ARPC2 byla data z mikroskopu nejprve upravena v softwaru ZEN blue 3.1. Byl vytvořen subset časové řady, který splňoval následující požadavky: měl čtvercové rozměry, byl minimálně 55 snímků dlouhý a nedošlo ke změně roviny ostrosti. Analýza dále probíhala v softwaru Fiji. Byla vytvořena maximální projekce subsetu zvlášť pro zelený a zvlášť pro červený kanál. V maximálních projekcích byly segmentovanou čarou proloženy postupně všechny signifikantní tečky. Tyto segmentované čáry pak byly aplikovány na původní subset a byly vytvořeny kymogramy (plugin KymographBuilder), (Obr. 6). Poté bylo spočítáno celkové množství „Exo84b“ a „ARP2/3“ teček zachycených na kymogramech a množství zaznamenaných kolokalizací signálů. Jako kontrolní postup byl vždy jeden z kanálů otočen o 90 °, následně byl na kanál se zachovanou orientací aplikovány ty samé segmentované čáry a vytvořeny kymogramy.



Obrázek 6: zjednodušené schéma obrazové analýzy.

4.1.8 FARMAKOLOGIE

Pro ošetření latrunkulinem B (koncentrace zás. roztoku = 2,53 mM, rozpuštěno v DMSO) a BDM (2,3-butanedione monoxime, Merck, B0753-25G) byly *in vitro* pěstované rostliny asi 4 dny po vysetí přeneseny do vícejamkové Petriho misky s roztokem latrunkulinu B (výsledná koncentrace = 50 nebo 500 nM) nebo BDM (výsledná koncentrace = 100 mM) v tekutém minimálním mediu (kontrolní rostliny pouze v tekutém mediu, viz tab. 2, pouze bez agaru). Rostliny byly ponechány ošetření přes noc, při pokojové teplotě, za stálého pomalého míchání na třepačce.

Při experimentu s BFA (koncentrace zás. roztoku = 100 mM, rozpuštěno v DMSO) bylo BFA přidáno do media, kterým byly naplněny plastové Petriho misky (výsledná koncentrace = 25 μ M). Na ztuhlé medium byla naseta sterilní semínka a následovala *in vitro* kultivace. Kontrolní rostliny rostly na mediu s DMSO (2 μ M). Mikroskopie probíhala po 5 dnech od nasetí.

4.1.9 IZOLACE PROTEINŮ

4.1.9.1 CYTOSOLICKÁ FRAKCE

Rostlinný materiál byl zamražen na -80 °C v tekutém dusíku. Následně byl rozdrcen na jemný prášek pomocí třecí misky a tloučku předchlazenými tekutým dusíkem. Pak byl prášek přenesen do předchlazené zkumavky, kde byl ke vzorku přidán extrakční pufr (Tab. 4) v poměru 1 :1 (v/w). Vzorek s puforem byl ponechán do roztátí na ledu a krátce promíchán třepáním. Poté byl vzorek centrifugován při 4 °C, 15 minut, 4000 g, pro oddělení fragmentů buněčné stěny. Supernatant byl pipetováním přenesen do čisté zkumavky a znovu centrifugován, tentokrát při 4 °C, 30 minut, 27000g Supernatant byl opět pipetováním přenesen do čisté zkumavky a použit jako cytosolická frakce.

4.1.9.2 FRAKCE SE SOLUBILIZOVANÝMI MEMBRÁNOVÝMI PROTEINY

Rostlinný materiál byl zamražen na -80 °C v tekutém dusíku. Následně byl rozdrcen na jemný prášek pomocí třecí misky a tloučku předchlazených tekutým dusíkem. Prášek byl přenesen do předchlazené zkumavky, kde byl ke vzorku přidán extrakční pufr (Tab. 4) v poměru 1:1 (v/w). Vzorek s puforem byl ponechán roztátí na ledu a krátce promíchán třepáním. Poté byl vzorek centrifugován při 4 °C, 15 minut , 4000 g, pro oddělení fragmentů buněčné stěny. Supernatant byl pipetováním přenesen do čisté zkumavky. K supernatantu byl přidán extrakční pufr s rozpuštěným detergentem CHAPS (Cholamidopropyl-dimethyl-ammonio-1-propane sulfonate, Merck, CHAPS-

RO) o koncentraci 120 mM tak, aby byla výsledná koncentrace CHAPS 40 mM (tedy v poměru 1:3). Vzorek byl 50 min kýván na ledu. Následovala ultracentrifugace při 4 °C, 60 minut, 48000g. Supernatant byl pipetováním přenesen do čisté zkumavky a použit jako cytosolická frakce se solubilizovanými membránovými proteiny.

Tabulka 4: složení extrakčního pufru.	
MES	50 mM
EGTA	10 mM
MgCl ₂	10 mM
Glycerol	2 M
Koktejl inhibitorů proteáz (Merck, P9599)	1 μM
pH (KOH)	6,9

4.1.10 KOIMUNOPRECIPITACE

Pro koimunoprecipitaci byl použit μMACS GFP isolation kit (Miltenyi Biotec130-091-125) a bylo postupováno podle přiloženého protokolu.

Proteinový extrakt byl smíchán s anti-GFP magnetickými kuličkami v poměru 50 μl kuliček na 1 ml supernatantu. Vzorek byl ponechán při mírném kývání na ledu po dobu 30 minut. Mezitím byly kolony umístěny do magnetického stojanu a při teplotě 4 °C byly promyty 200 μl lysis pufru. Po ukončené inkubaci vzorku s kuličkami byl vzorek napipetován do kolony, ve které se v magnetickém poli zachytily magnetické kuličky. Následovalo promytí kolonek promývacím pufrem W1 4x 200 μl, a 1x promytí 100 μl W2 pufru. Poté bylo za pokojové teploty na kolony napipetováno 20 μl extrakčního pufru ohřátého na 95 °C a kolony byly ponechány 5 minutové inkubaci. Po uběhnutí inkubační doby bylo na kolony napipetováno 50 μl ohřátého E pufru, eluát zachycen do zkumavky a okamžitě separován pomocí SDS-PAGE elektroforézy.

4.1.11 SDS-PAGE

Izolované proteiny byly smíchány 1:1 s vysoce denaturujícím pufrem (Tab. 5) a nanášeny do jamek akrylamidového gelu (Tab. 6). V případě GFP-trap analýzy byl do jamek rovnou nanášen zachycený eluát.

Tabulka 5: složení vysoce denaturujícího pufru, 1 L.	
Tris/HCl	50 mM
SDS	20 g
Močovina	8 M
Glycerol	300 g
Merkaptoetanol	50 ml
Bromfenolová modř	5 g
pH	6,8

Tabulka 6: složení polyakrylamidových gelů.			
	zaostřovací 4%	dělicí 10%	dělicí 15%
Směs akrylamidových monomerů (akrylamid/bisakrylamid 30%, Merck , A3574)	1.05 ml	6 ml	10 ml
Tris/HCl 0,5 M, pH = 6,8	1.875 ml	-	-
Tris/HCl 1,5 M, pH = 8,8	-	4.5 ml	5 ml
H ₂ O	4.5 ml	7.2 ml	3.8 ml
10% Dodecylsírán sodný (SDS)	75 µl	180 µl	200 µl
40% Amonium persulfát	15 µl	22.5 µl	30 µl
TEMED	3.75 µl	6 µl	11.5 µl

Pro elektroforézu byly použity 10% či 15% polyakrylamidové gely o velikosti 10,5 x 11 cm s asi 2 cm vrstvou 4% zaostřovacího gelu. Jako velikostní marker byl použit PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific, 26619) o objemu 4 µl.

Skla pro přípravu elektroforézy byla očištěna 70% etanolem, sestavena a byl mezi ně vlit dělicí gel, který byl převrstven 1 ml destilované vody a ponechán 30 minutové polymeraci. Po uplynutí doby byla voda vylita a na dělicí gel byl nalit zaostřovací gel, do kterého byl ponořen 70% etanolem očištěný hřeben pro vytvoření jamek. Po 30 minutové polymeraci byl hřeben opatrně vytažen. Skla s gelem byla svorkami připevněna v elektroforetické soustavě a do spodní i vrchní komory byl vlit elektroforetický pufr (Tab. 7). Dokud vzorky procházely zaostřovacím gelem, bylo nastavení elektroforézy $U = 50 \text{ V}$, $I = 10 \text{ mA/gel}$, $P = 70 \text{ W}$, po průchodu do dělicího gelu bylo změněno na: $U = 100 \text{ V}$, $I = 25 \text{ mA/gel}$, $P = 70 \text{ W}$, celkově dělení probíhalo asi 3 hodiny.

Tabulka 7: složení elektroforetického pufru.	
Tris/HCl	25 mM
Glycin	0.192 M
Dodecylsírán sodný (SDS)	0,10%

4.1.12 WESTERN BLOT

Jakmile čelo elektroforézy prošlo gelem a vylilo se do spodní komory elektroforetického aparátu, byla elektroforéza ukončena. Gel byl vyjmut ze skel, byl odstraněn zaostřovací gel a dělicí gel byl položen na nitrocelulózovou membránu namočenou v transferovém pufru (Tab. 8), která ležela na 3 vrstvách blotovacího papíru (Whatman® 3MM), také namočených v transferovém pufru. Gel byl překryt dalšími 3 vrstvami namočeného blotovacího papíru. Z této soustavy byly skleněným válečkem odstraněny bubliny a bylo přiklopeno víko blotovadla. Transfer proteinů probíhal za nastavení: 300 V, 300 mA, 10 W , u menších cílových proteinů (do 70 kDa) 1 hod, u větších 3 hod.

Tabulka 8: složení transferového pufru.	
Tris/HCl	100 mM
Glycin	180 mM
Metanol	20 %
pH	8,3

Pro přenesení proteinů byla nitrocelulózová membrána s nablotovanými proteiny vložena do TBS pufru (Tab. 9) s 4% sušeným odtučněným kravským mlékem pro zablokování epitopů. Takto byla membrána inkubována přes noc za stálého kývání při 4 °C. Po zablokování byla membrána přenesena do roztoku primární protilátky (Tab. 10) v TBS pufru, kde byla za stálého kývání inkubována při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Poté byla membrána 3x 10 minut promyta v čistém TBS pufru. Následně byla membrána vložena do roztoku sekundární protilátky (Tab. 11) v TBS pufru, kde byla za stálého kývání při pokojové teplotě inkubována po dobu 45 minut. Pak byla 2x 10 minut promyta v TBS pufru a následovala vizualizace pomocí ECL systému.

Tabulka 9: složení TBS pufru.	
Tris/HCl	20 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	1 %
pH	7,4

Tabulka 10: primární protilátky použité při WB.				
Interakce	zdroj	zvíře	ředění	výrobce
Anti-GFP	<i>Aequorea victoria</i>	králík	1:4000	Agrisera, AS15 2887
Anti-mCh	rekombinantní mCh	králík	1:4000	Abcam, ab167453

Tabulka 11: sekundární protilátky použité při WB.			
Interakce	marker	ředění	výrobce
Anti-rabbit	HRP	1:6000	Enzo, ADI-SAB-300-J

4.1.13 ECL

Proteiny na membráně byly vizualizovány pomocí chemiluminiscenčního systému ECL. Sekundární protilátka označená křenovou peroxidázou (HRP) byla zviditelněna pomocí kitu ECL (ThermoFisher Scientific, 32209). Membrána byla na 1 minutu inkubována v čerstvě namíchaném reakčním roztoku, načež byla umístěna mezi dvě folie a spolu s rentgenovým filmem uzavřena do expoziční kazety. Expoziční čas se pohyboval mezi 1 a 15 minutami, v závislosti na síle signálu. Poté byl film vyjmut, na 2 minuty vložen do vývojky pro RTG materiál, opláchnut krátce v kohoutkové vodě a pak asi 10 minut ponechán v ustalovači. Posléze byly vyvolané RTG filmy několikrát promyty ve studené vodě. Po uschnutí byly vizualizované proteiny porovnány s velikostním markerem na membráně. Práce s nevyvolaným RTG filmem probíhaly v temné komoře při osvětlení pouze červeným světlem pro temné komory.

5 VÝSLEDKY

5.1 CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH MARKEROVÝCH LINIÍ

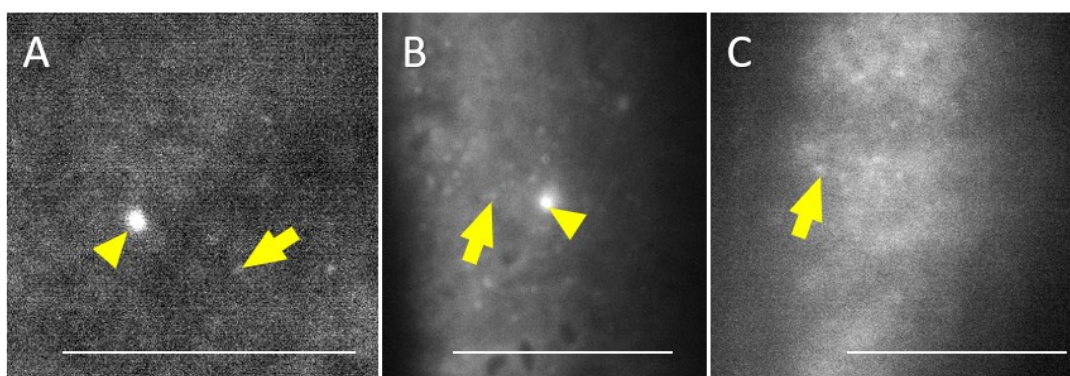
Vybrané markery byly charakterizovány pomocí TIRF mikroskopie (někdy označované také jako VAEM). Tento přístup umožňuje pozorovat dění na plazmatické membráně, a to s lepším rozlišením, než jakého lze dosáhnout použitím běžné LSC mikroskopie. Důvodem je osvětlení pouze malé oblasti těsně přiléhající k plazmatické membráně, kdy obraz není zatížen světlem z hlubších částí cytoplazmy.

Kromě vizualizace jsem u některých markerových linií přistoupila k farmakologickým nástrojům.

5.2 ARP2/3

Fluorescenčně značené podjednotky proteinového komplexu ARP2/3 GFP-AtARPC2 (číslo v laboratorní databázi F031), iGFP-NtARPC2 (F010) a GFP-AtARPC5 (F014) byly vizualizovány pomocí TIRFM. U všech byla podobná lokalizace – difuzní signál v cytoplazmě (často s „negativně“ značenými organelami); na peroxisomech v podobě arposomu (struktura ARP2/3 kolokalizující s peroxisomy, Martinek et al., rukopis v přípravě) a dosud nepopsaná lokalizace ve formě drobných teček v těsné blízkosti PM (Obr. 7, Vid. 1, 2, 3).

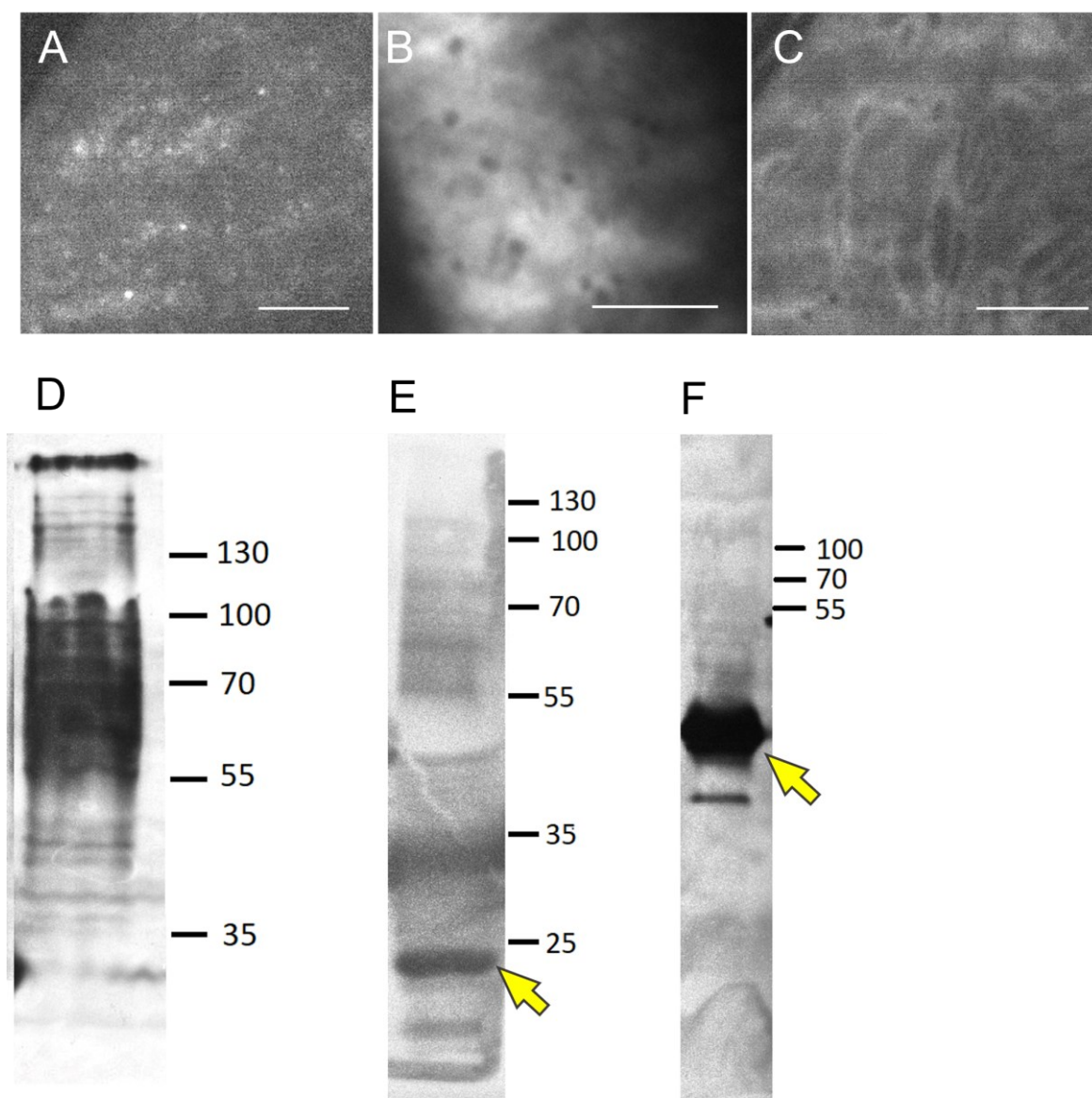
Tečky vykazovaly specifickou dynamiku. Po objevení se tečky tyto struktury zůstávaly na stejném místě – nevykazovaly výrazný laterální pohyb na rozdíl od arposomu – a posléze opět z místa zmizely. Čas, strávený strukturou ve stabilní poloze, pravděpodobně na PM, byl různý. Tento čas budu nazývat dwelling time (DT)



Obrázek 7: Podjednotky ARP2/3 proteinového komplexu v kortikální vrstvě pozorované pomocí TIRFM. (A) GFP-AtARPC2 (F031), (B) iGFP-NtARPC2 (F010), (C) GFP-AtARPC5 (F014), šipky označují drobné kortikální tečky, hrot šipky větší strukturu arposomu. Měřítko = 10 μ m.

a pohyboval se mezi 100 ms a přibližně 12 s), Nejvhodnější expoziční čas pro pozorování bylo 100 – 500 ms. Nejlépe byly vidět u indukovatelného markeru iGFP-NtARPC2 (Obr. 7B). Mezi jednotlivým rostlinami a buňkami existuje velká variabilita v množství a vůbec přítomnosti teček, ale faktory, které vedou k této variabilitě, nebyly blíže identifikovány.

V průběhu vypracovávání diplomového projektu jsem narazila na problém – ukázalo se, že lze u námi hojně používané linie exprimující 35S::GFP v TIRFM také pozorovat tečky (Obr. 8A). Potom by ovšem byly ARP2/3 tečky pouhým artefaktem.



Obrázek 8: Různé linie exprimující volné GFP v TIRFM (A - C), WB detekce za použití anti-GFP, GFP ~ 27kDa, označeno šipkami (D - F). (A, D) Závadná linie "35S::GFP" (F016), (B, E) 35S::GFP (F064), (C, F) XVE-GFP (F062). Měřítka = 5 μ m.

Po proteinové izolaci a následné WB analýze této 35S::GFP linie však vyšlo najevo, že linie exprimuje jiný, neidentifikovaný fluorescenčně značený protein, protože GFP označený protein neodpovídal velikostí GFP (Obr. 8D). Tato linie, označena v laboratorní databázi číslem F016, byla vyřazena z dalších pokusů.

Následné přezkoumání jiných dostupných linií exprimujících volné GFP v TIRFM tečky nezjistila (Obr. 8B, C). Jedná se o linii *Arabidopsis thaliana* exprimující 35S::GFP s číslem databáze F064, a linii *Arabidopsis thaliana* exprimující GFP pod estradiolem indukovatelným promotorem (XVE::GFP, Bokvaj, 2012), s číslem databáze F062. Biochemická analýza linií potvrdila, že se jedná o skutečné volné GFP proteiny (Obr. 8 E, F), což dále podporuje autentičnost ARP2/3 teček.

5.3 ENDOMEMBRÁNOVÉ MARKERY

Endomembránové markery byly vybrány na základě dostupnosti a relevance jejich lokalizace pro vysvětlení souvislostí ARP2/3 a endomembránového systému.

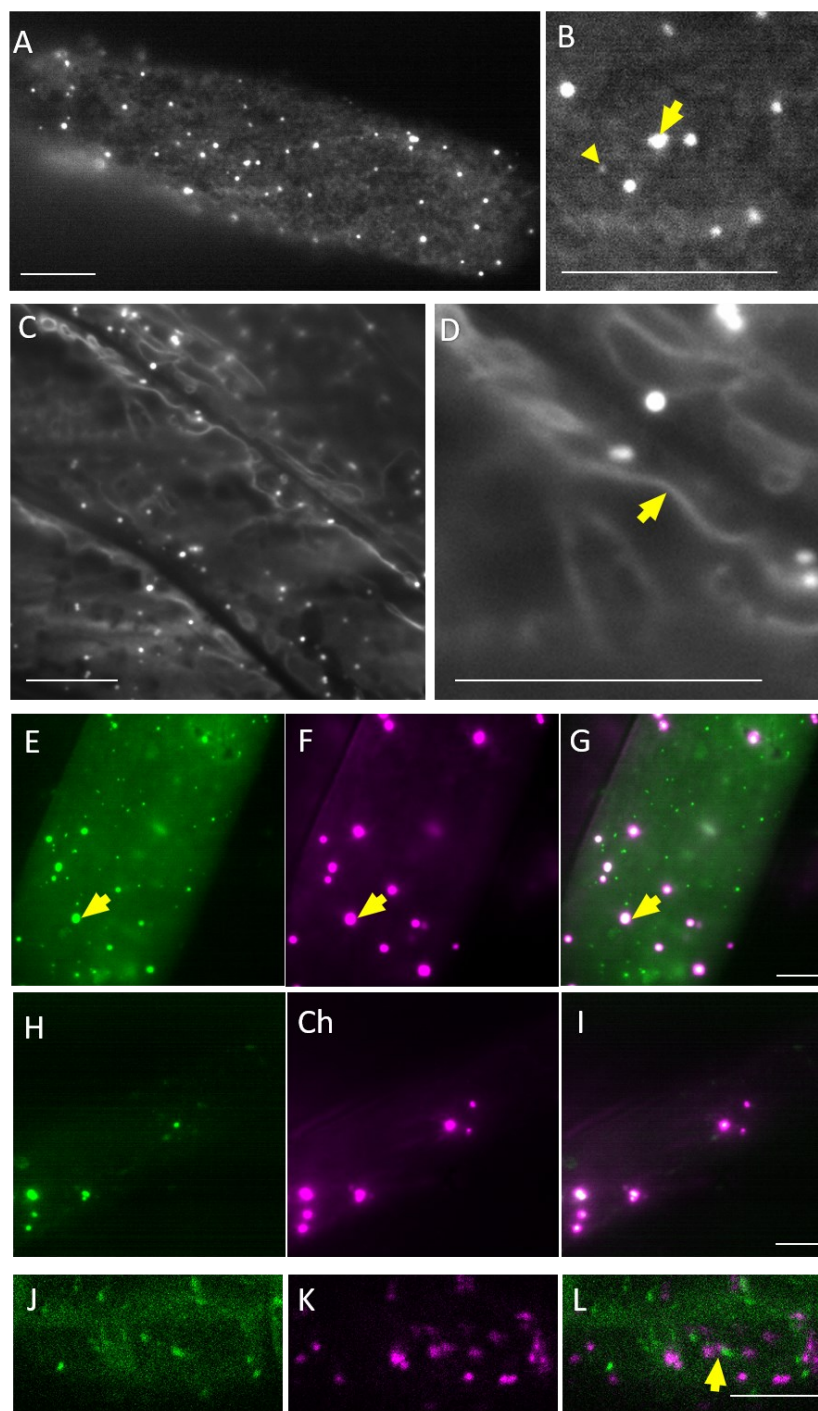
5.3.1 FYVE

GFP-FYVE marker podle literatury lokalizuje v buňce v LE/MVB a na tonoplastu (Vemeer et al., 2006). Vizualizace GFP-FYVE pomocí TIRFM ukázala lokalizaci markeru na tonoplastu, dále v kulovitých strukturách různých velikostí (Obr. 9A-D).

Při pohledu do kortikální vrstvy lze vidět plošný zrnitý signál tonoplastu a pak množství pohyblivých váčků větších (již dříve popsanych z LSCM jako LE/MVB) a menších, jejichž identita není zatím známá (Obr. 9A, B, Vid. 4, 5). Hluběji v cytoplazmě je tonoplastová lokalizace dobře patrná, váčků je zde méně (Obr. 9C, D, Vid. 6, 7). Váčky se pohybují s různou rychlostí a různými směry, někdy nezávisle na sobě, někdy ve skupinách zřejmě v rámci proudění větších objemů cytoplazmy.

Pro ověření identity váčků jsem nakřížila GFP-FYVE linii s liniemi s fluorescenčně značeným GA (mCherry-Man1 (Nelson, Cai and Nebenführ, 2007), v laboratorní databázi F017) a peroxisomálním markerem (mCherry-PTS1 (Nelson, Cai and Nebenführ, 2007), v laboratorní databázi jako F023) markerem. V těchto dvojitých liniích pak bylo možno vyhodnotit případnou kolokalizaci.

U dvojité linie GFP-FYVE/mCh-Man1 měl GA-marker mozaikovitou expresi a najít tak buňku, která by zároveň exprimovala oba markery a přiléhala ke sklíčku, aby ji šlo snímat pomocí TIRFM, bylo problematické. Podařilo se mi to až v F2 generaci.



Obrázek 9:

TIRF vizualizace GFP-FYVE (**A-D**). (**A**) Pohled na celou buňku, (**B**) detail z (**A**), šipka označuje větší strukturu, hrot šipky menší. (**C**) GFP-FYVE hlouběji v cytoplazmě, (**D**) detail z (**C**), šipka označuje tonoplast.

(**E-G**) Kolokalizace s peroxisomálním markerem, šipky označují místo bleed-through, (**E**) GFP-FYVE, (**F**) mCh-PTS1, (**G**) sloučeno.

(**H-I**) Dvoukanálové TIRFM snímání peroxisomálního markeru mCh-PTS1. (**H**) Marker v zeleném kanálu, kde by ideálně neměl být žádný signál, (**Ch**) v červeném kanálu, (**G**) sloučeno.

(**J-L**) LSCM kolokalizace GFP-FYVE s GA markerem, (**J**) GFP-FYVE, (**K**) mCh-Man1, (**L**) sloučeno, šipka ukazuje na místo setkání signálů.

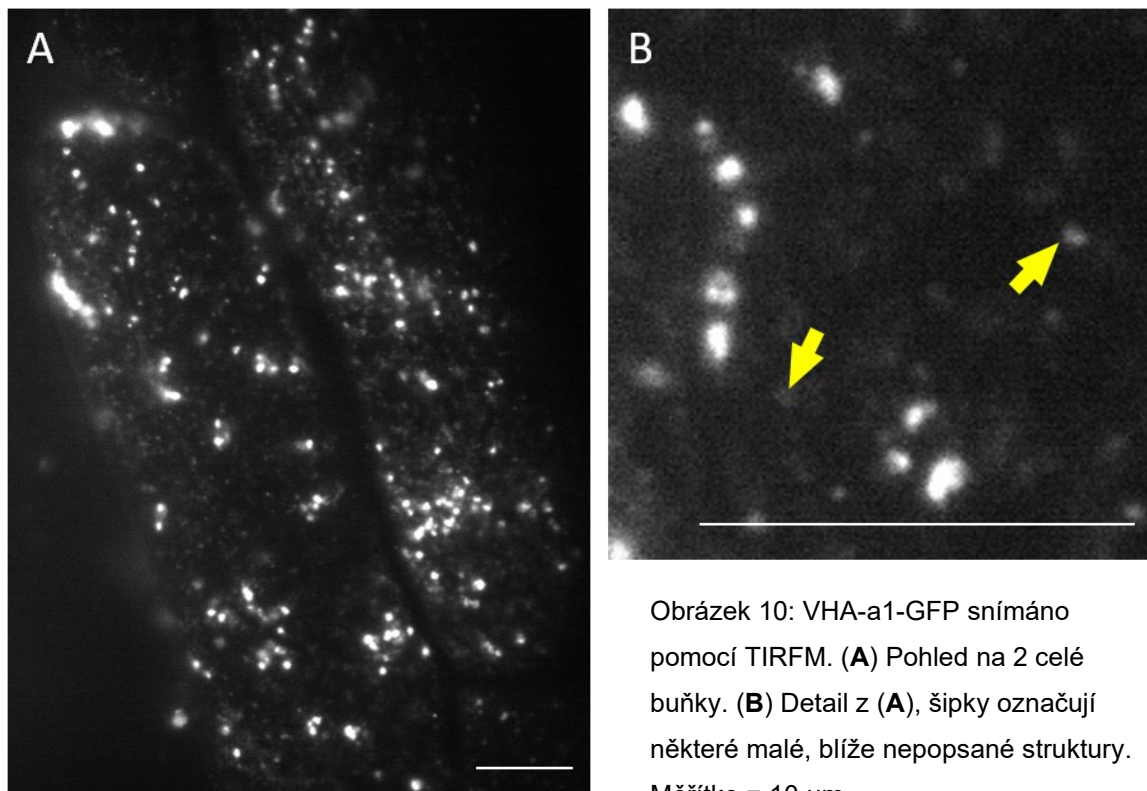
Měřítka = 10 μ m.

Dalším problémem je nastavení filtrů na TIRFM mikroskopu, kde červený kanál se silným signálem v nastavení pro rychlé dvoukanálové snímání přesvěcuje do zeleného kanálu (tzv. bleed-through - neukázáno). Protože i linie s peroxisomálním markerem měla silný signál v červeném kanálu, byl problém s bleed-through i u GFP-FYVE/mCh-PTS1 linie (Obr. 9E-F). Toto bylo následně ověřeno snímáním linie obsahující pouze mCherry-PTS1. Lze vidět, že signál je i v druhém kanálu, kde by ideálně neměl být žádný (Obr. 9H-I).

V případě dvojité linie GFP-FYVE/mCherry-Man1 bylo nakonec přistoupeno k pozorování pomocí LSCM, kde lze oba kanály separovat. Pozorovatelné FYVE pozitivní váčky s GA nekolokalizovaly, a ačkoliv se občas setkávaly, nedocházelo k žádnému splývání váčků a nejspíš se jedná o odlišné kompartmenty (Obr. 9J-L, Vid. 8), což je v souladu se známou literaturou (Vermeer et al., 2006).

5.3.2 VHA-A1

Marker VHA-a1 lokalizuje podle literatury v buňce TGN/EE a časné endosomy (Dettmer et al., 2006). Při snímání VHA-a1-GFP pomocí TIRFM lze vidět větší, pomalu se pohybující struktury, pravděpodobně TGN/EE, popsané v literatuře. Kromě nich lze



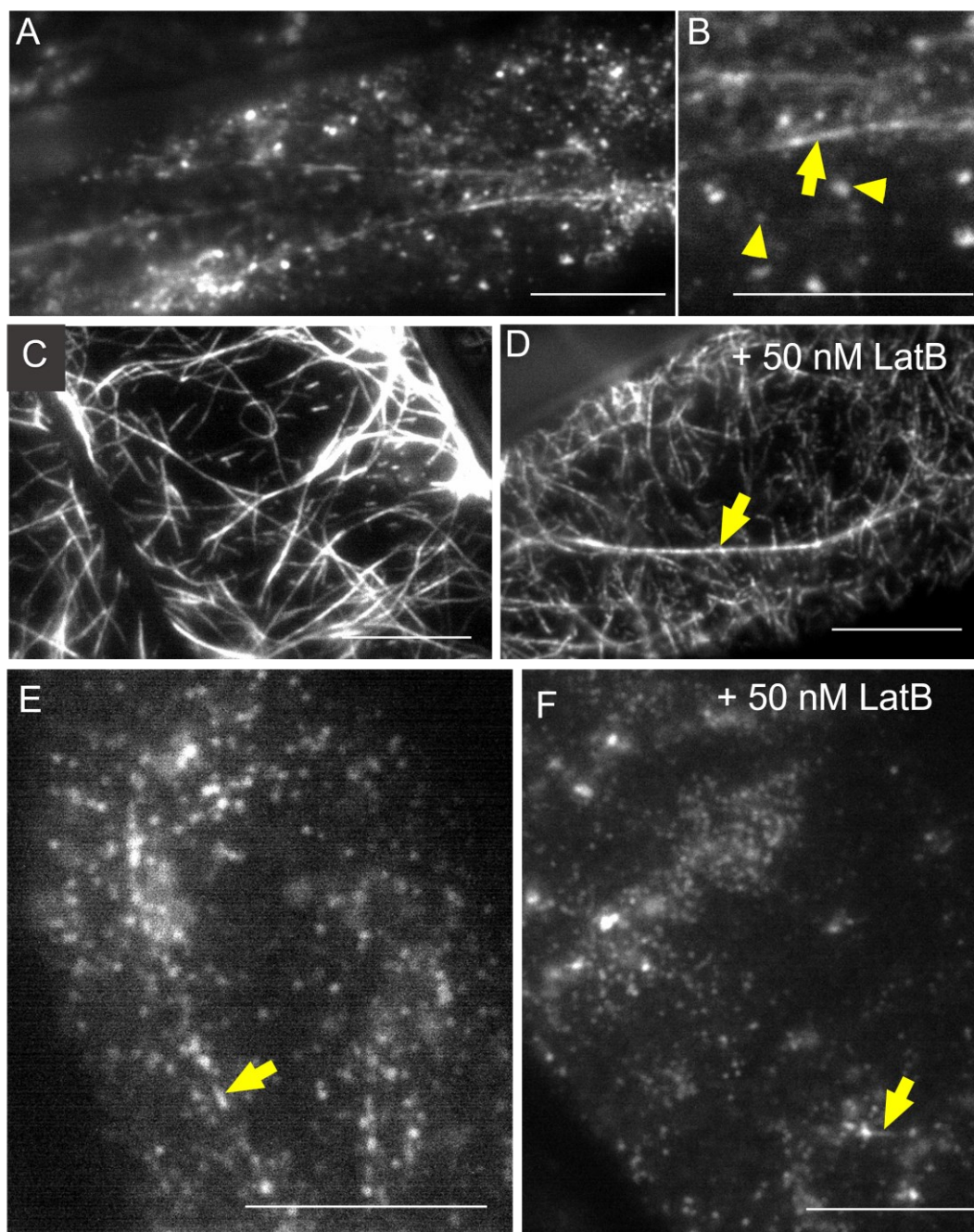
Obrázek 10: VHA-a1-GFP snímáno pomocí TIRFM. (A) Pohled na 2 celé buňky. (B) Detail z (A), šipky označují některé malé, blíže nepopsané struktury. Měřítko = 10 μ m.

detekovat i velmi malé a dynamické struktury neznámého charakteru. Tyto malé struktury se vyskytovaly spíše blíže k PM, při proostření hlouběji, kde TGN/EE byly stále patrné, menší struktury mizely (neukázáno). Malé struktury se pohybovaly autonomně a s různou dynamikou (Obr. 10, Vid. 9, 10).

5.3.3 RAB A1G

Buněčná lokalizace markeru RabA1g je podle literatury endosomální (recyklující endosom) (Geldner et al., 2009). Vizualizace RabA1g pomocí TIRFM ukázala, že marker značí různě velké a různě dynamické váčky - endosomy. Nápadná je část endosomů, které se pohybují napříč buňkou vysokou rychlostí, další části se pohybují jen na malé ploše, či téměř vůbec, a to nezávisle na velikosti (Obr. 11A,B, Vid. 11, 12).

Rychle pohybující se endosomy jsou podezřelé z pohybu závislého na aktinu. Při ošetření málo koncentrovaným latrunkulinem B (50 nM) bylo vidět u jednotlivých buněk snížení dynamiky rychlých endosomů (Vid. 13). U některých pozorovaných buněk však byla dynamika zachována. Důvodem byla zřejmě použitá nízká koncentrace latrunkulinu B, protože nedošlo ani ke spolehlivé depolymerizaci aktinu (GFP-FABD, (Voigt et al., 2005)) (Obr. 11D).

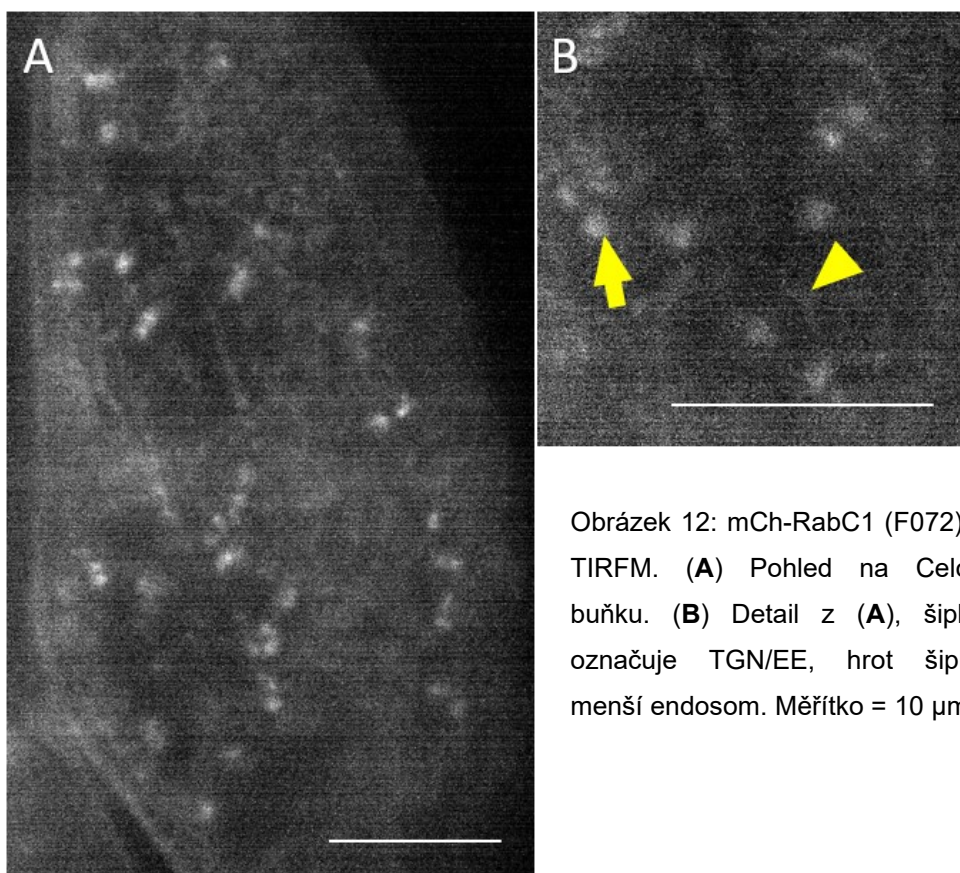


Obrázek 11: mCh-RabA1g (F073) v TIRFM (**A,B**). (**A**) Pohled na celou buňku. (**B**) Detail z (**A**), šipka označuje rychlé endosomy, pohybující se napříč buňkou, v důsledku rychlosti mají na snímku protáhlý tvar, hrot šipky označuje méně dynamické endosomy.

Efekt 50 nM LatB (**C-F**). (**C**) GFP-FABD bez ošetření, (**D**) GFP-FABD po ošetření, šipka označuje stále se vyskytující aktinový kabel. (**E**) RabA1g-RFP marker bez ošetření, (**F**) mCh-RabA1g po ošetření, šipky označují rychle se pohybující váčky. Měřítka = 10 μ m.

5.3.4 RABC1

Marker RabC1 má v buňce post-Golgi a endosomální lokalizaci (Geldner et al. 2009). U linie exprimující marker RabC1 byla v TIRFM patrná lokalizace ve strukturách připomínajících svou velikostí a strukturou GA, tedy TGN/EE lokalizace. Dále bylo možné pozorovat množství malých endosomů pohybujících se s prouděním cytoplazmy po buňce (Obr. 12, Vid. 14, 15). Síla signálu tohoto markeru byla dost nízká a nepodařilo se mi získat snímky s lepším rozlišením.



Obrázek 12: mCh-RabC1 (F072) v TIRFM. (A) Pohled na Celou buňku. (B) Detail z (A), šipka označuje TGN/EE, hrot šipky menší endosom. Měřítko = 10 μ m

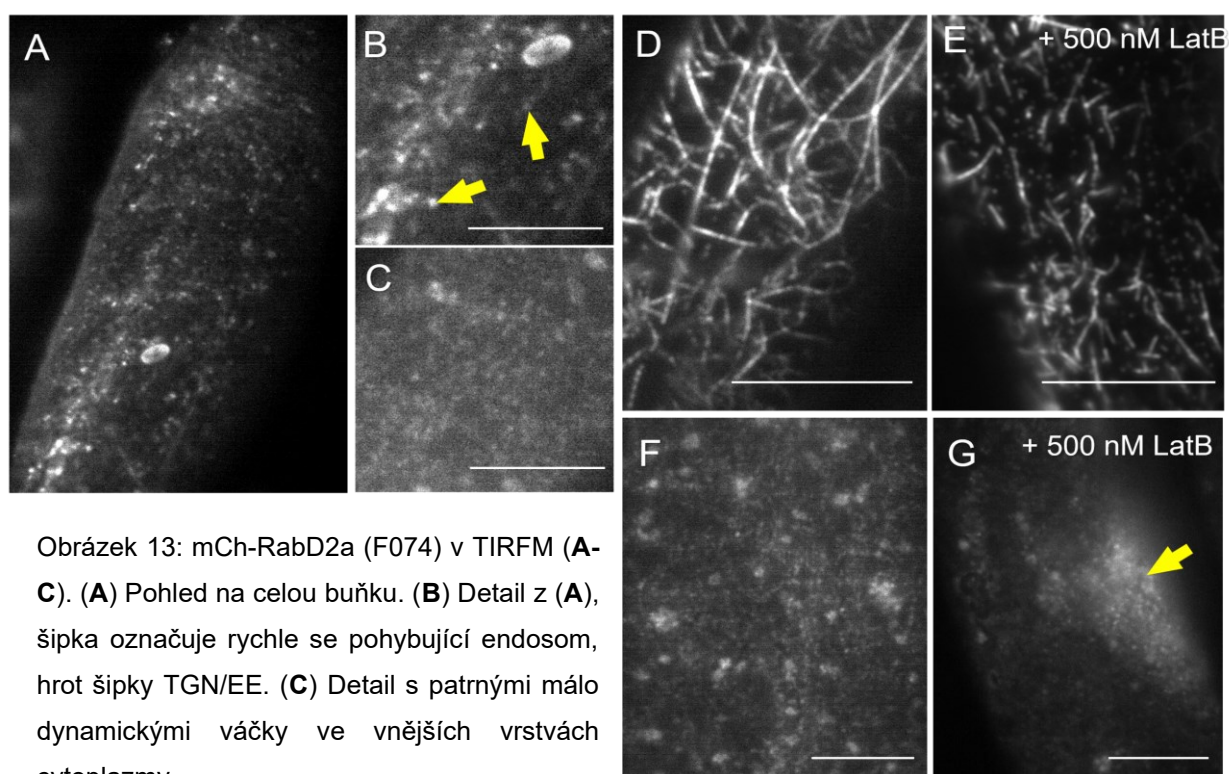
5.3.5 RABD2A

Marker RabD2a je v literatuře popisován jako marker značící velké množství struktur, což bylo mým pozorováním podpořeno. Lze pozorovat pravděpodobnou TGN/EE lokalizaci, dále velké množství různě velkých a různě dynamických struktur (Obr. 13A-C).

V kortikální vrstvě lze pozorovat velké množství méně dynamických endosomů se slabším signálem (Obr. 13 C, Vid. 16). Hluběji v cytoplazmě se vyskytují endosomy pohybující se na větší vzdálenosti velkou rychlostí (Obr. 13A, B, Vid. 17, 18).

Pro objasnění povahy malých endosomů ve vnějších vrstvách cytoplazmy bylo použito ošetření LatB. Nižší koncentrace 50 nM nezpůsobila viditelné změny v dynamice endosomů (neukázáno). Při použití vyšší koncentrace 500 nM došlo k agregacím TGN/EE a větších endosomů, malé endosomy ovšem i zde zůstaly bez viditelné změny dynamiky (Obr. 13G, Vid. 19). Jako kontrola působení LatB byl opět použit GFP-FABD a při použití vyšší koncentrace došlo ke znatelné fragmentaci aktinové sítě (Obr. 13E).

Pro ověření identity kompartmentů značených tímto markerem jsem přistoupila k ošetření rostlin BFA. Aplikace 25 μ M BFA viditelně neovlivnila velké struktury a ani dynamiku malých endosomů (Vid. 20). Dále jsem použila BDM (2,3-butandione monoxime), myozinový inhibitor (Siegman et al., 1994). Při použití poměrně vysokých koncentrací (100 mM) došlo i k úplnému zastavení pohybu endosomů u povrchu buňky (Vid. 21).



Obrázek 13: mCh-RabD2a (F074) v TIRFM (**A-C**). (**A**) Pohled na celou buňku. (**B**) Detail z (**A**), šipka označuje rychle se pohybující endosom, hrot šipky TGN/EE. (**C**) Detail s patrnými málo dynamickými váčky ve vnějších vrstvách cytoplazmy.

Efekt 500 nM LatB (**D-G**). GFP-FABD bez ošetření (**D**), GFP-FABD ošetřeno (**E**). mCh-RabD2a, bez ošetření (**F**), mCh-RabD2a ošetřeno (**G**), lze vidět akumulaci signálu (šipka). Měřítka = 10 μ m.

6 INTERAKCE PODJEDNOTEK ARP2/3 S ENDOSOMÁLNÍMI MARKERY

6.1 OPTICKÁ KOLOKALIZACE PODJEDNOTEK PROTEINOVÉHO KOMPLEXU ARP2/3 S RAB PROTEINY

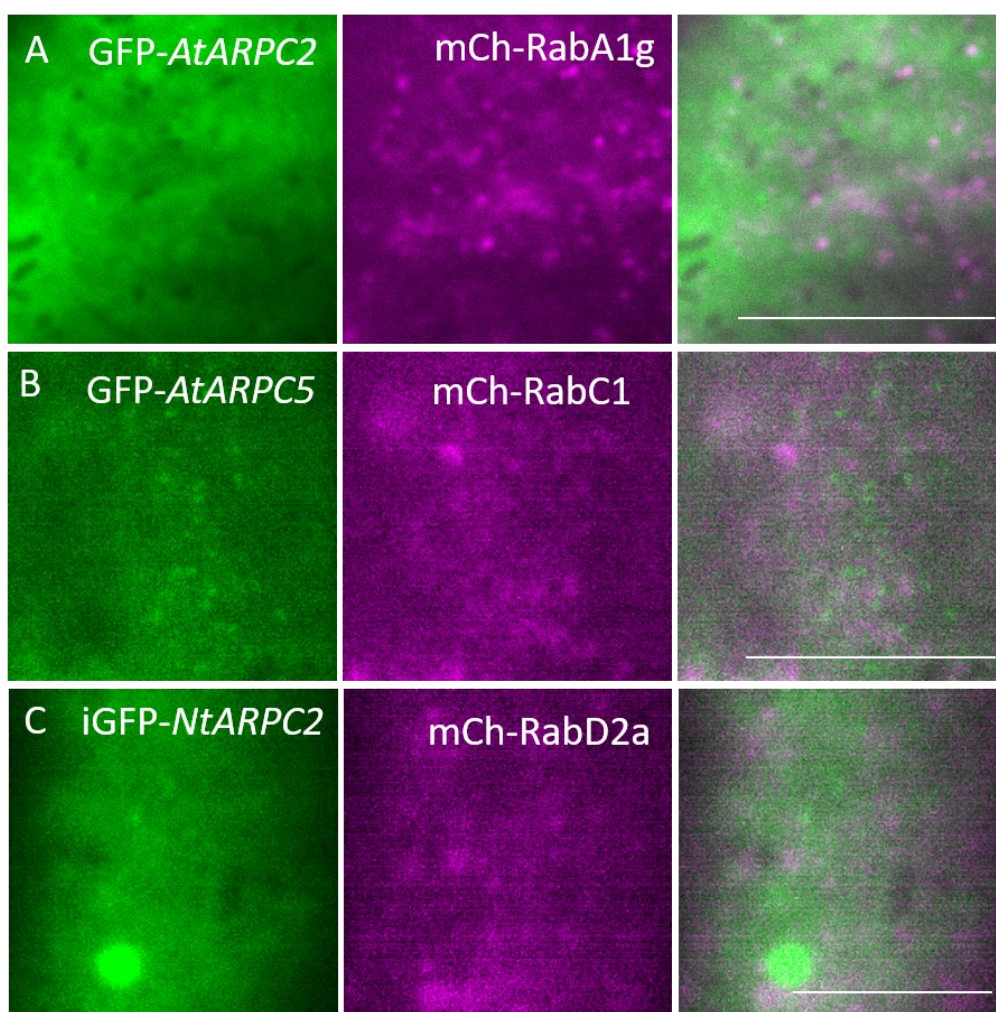
Pro pokus o bližší charakteristiku ARP2/3 teček a zjištění, zda kolokalizují s některým z kompartmentů značených výše popsány markery, jsem křížením zhotovila celkem 9 dvojíých linií (Tab. 12).

Tabulka 12: Dvojité markerové linie ARP2/3 podjednotek a Rab proteinů.		
mCh-RabA1g/GFP- <i>At</i> ARPC2	mCh-RabC1/GFP- <i>At</i> ARPC2	mCh-RabD2a/GFP- <i>At</i> ARPC2
mCh-RabA1g/iGFP- <i>Nt</i> ARPC2	mCh-RabC1/iGFP- <i>Nt</i> ARPC2	mCh-RabD2a/iGFP- <i>Nt</i> ARPC2
mCh-RabA1g/GFP- <i>At</i> ARPC5	mCh-RabC1/GFP- <i>At</i> ARPC5	mCh-RabD2a/GFP- <i>At</i> ARPC5

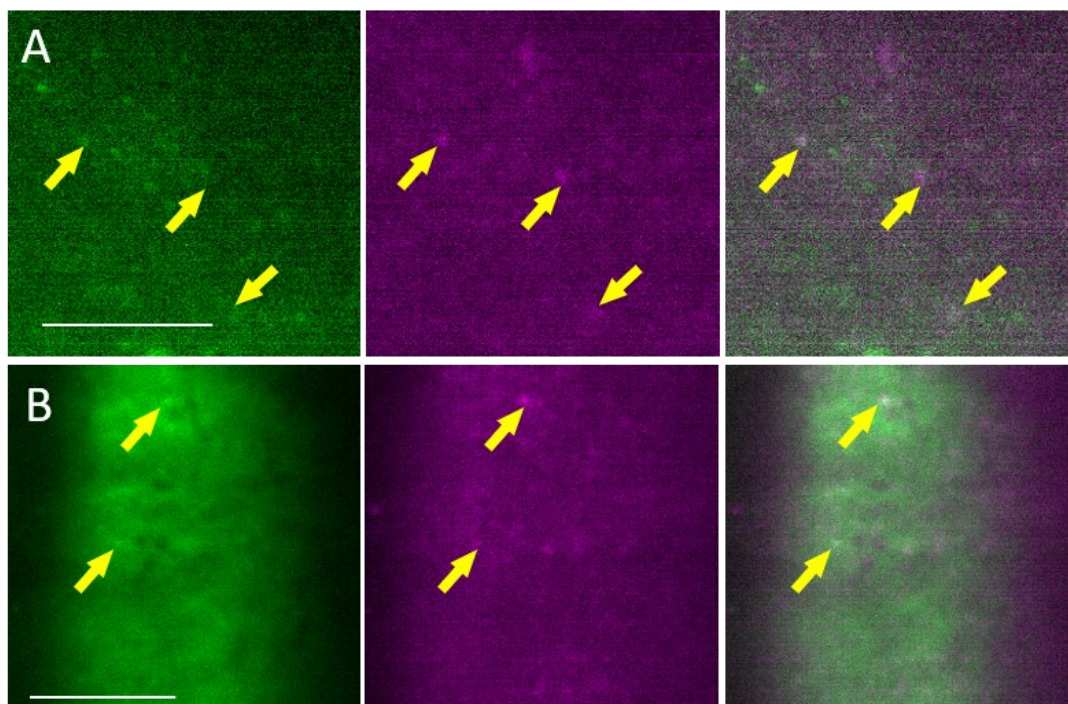
Snímání dvojíých linií podjednotek ARP2/3 s RabA1g a RabC1 neukázalo žádnou zřejmou kolokalizaci signálů (Obr. 14, Vid. 22, 23, 24). U linií s RabC1 navíc vyšlo najevo, že většina RabC1 signálu v podobě TGN/EE je mimo rovinu, ve které se nacházejí ARP2/3 tečky a tak se u těchto linií a RabA1g linií interakce s ARP2/3 podjednotkami nepředpokládá. U linií obsahující RabD2a nebyla optická kolokalizace na pohled úspěšnější. Protože však RabD2a marker značí velké množství různých kompartmentů, z nichž některé byly drobné, špatně sledovatelné váčky v blízkosti PM, nebyla kolokalizace zcela vyloučena.

6.1.1 INTERAKCE PODJEDNOTEK ARP2/3 PROTEINOVÉHO KOMPLEXU S EXO84B

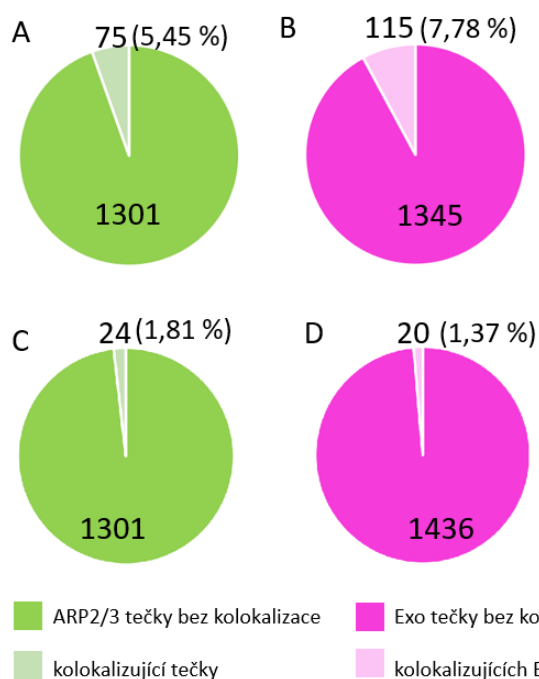
Pro tuto část mé práce byly použity již dříve nakřížené dvojité linie Exo84b-RFP/iGFP-*Nt*ARPC2 v laboratorní databázi FM076 a Exo84b-RFP/GFP-*At*ARPC5, v laboratorní databázi jako FM075. Protein Exo84b je lokalizován do podobných teček v blízkosti PM (Fendrych et al., 2013). Dynamika proteinu Exo84b se velmi podobala dynamice teček komplexu ARP2/3 – stabilní tečka bez laterálního pohybu s charakteristickým DT. Při snaze zpozorovat na snímcích kolokalizace se ukázalo, že k nim občas dochází (Obr. 15).



Obrázek 14: ukázka kolokalizací fluorescenčně značených Rab proteinů a podjednotek komplexu ARP2/3 v TIRFM. Měřítka = 5 μm.



Obrázek 15: Kolokalizace ARP2/3 podjednotek se značeným Exo84b v TIRF, šipky ukazují místa, kde signály kolokalizují. (A) iGFP-AtARPC2/Exo84b-RFP (FM076), (B) GFP-AtARPC5/Exo84b-RFP (FM075). Měřítko = 5 μ m.



Obrázek 16: Kvantifikace kolokalizace. (A, B) světlejší barva indikuje kolokalizující tečky, tmavší barva tečky bez kolokalizace. (C, D) kvantifikace kolokalizace s kontrolním postupem.

Analýza proběhla tak, že byly na snímku nalezeny všechny výrazné ARP2/3 tečky a mezi nimi hledány kolokalizující (A,C) nebo všechny výrazné Exo tečky a mezi nimi hledány kolokalizující (B,D).

Hodnoceno 7 snímků.

Jednoduchá obrazová analýza pomocí kymogramů, přinesla u obou dvojitých linií výsledek 5,45% kolokalizace pro ARP2/3 tečky a 7,78% pro Exo tečky. V případě kontrolního postupu, kdy byl jeden z kanálů otočen o 90°, jsem došla k nižšímu počtu kolokalizací 1,81 % pro ARP2/3 tečky a 1,37 % pro Exo tečky (Obr. 16)

6.2 BIOCHEMICKÝ PŘÍSTUP

Dalším krokem byl pokus o zjištění interakcí pomocí biochemického přístupu. Využila jsem metody GFP-trap, která umožňuje vychytat GFP značené proteiny z buněčného lyzátu spolu s jejich interaktory.

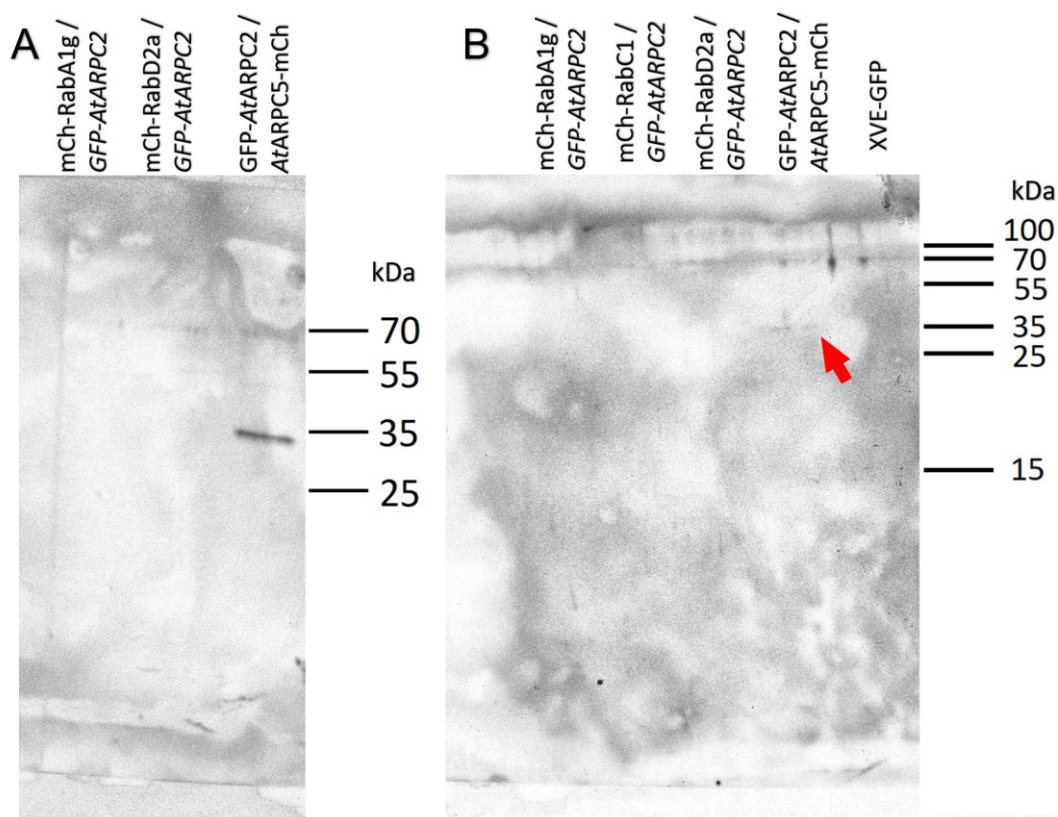
6.2.1 KOIMUNOPRECIPITACE PROTEINOVÉHO KOMPLEXU ARP2/3 S RAB PROTEINY

Na základě předchozího prozkoumání linií pomocí mikroskopie bylo rozhodnuto, že RabA1g linie s ARP2/3 spíše neinteraguje a poslouží jako negativní kontrola ke kandidátnímu interaktoru RabD2a a Exo84b. Ze stejného důvodu byla RabC1 linie byla z první analýzy vyloučena a v druhé prakticky plnila úlohu negativní kontroly. Vzhledem k dostupnosti rostlinného materiálu v době provedení experimentu byly vybrány dvojitě linie Rab proteinů s GFP-*At*ARPC2.

Jak již bylo zmíněno, Rab proteiny existují ve formě cytoplazmatické a vázané na membránu. Bylo proto třeba zohlednit různé frakce buněčného lyzátu.

Nejprve jsem analyzovala cytoplazmatickou frakci. Jako pozitivní kontrola byla použita linie obsahující GFP-*At*ARPC2/*At*ARPC5-mCherry, tedy fluorescenčně značené podjednotky stejného komplexu. Jak lze vidět na výsledné WB detekci (Obr. 17A), *At*ARPC5-mCh byl detekován pomocí anti-mCherry protilátky ve frakci proteinů zachycených v kolonce. Obě podjednotky komplexu ARP2/3 tedy spolu v mém experimentu koimunoprecipitovaly a pozitivní kontrola vyšla úspěšně. Ani jeden z Rab proteinů spolu s GFP-*At*ARPC2 nekosedimentoval, což naznačuje, že tyto analyzované proteiny s komplexem ARP2/3 neinteragují.

Dalším krokem byla analýza membránové frakce. Membrány byly před koimunoprecipitací rozpuštěny detergentem CHAPS, čímž došlo k solubilizaci v nich vázaných proteinů. Ani v tomto případě nedošlo ke kosedimentaci Rab proteinů s GFP-AtARPC2, zatímco GFP-AtARPC2 a AtARPC5-mCh proteiny v pozitivní kontrole opět kosedimentovaly (Obr.17B). Interakci námi vybraných Rab proteinů s komplexem ARP2/3 tak koimunoprecipitace neprokázala.



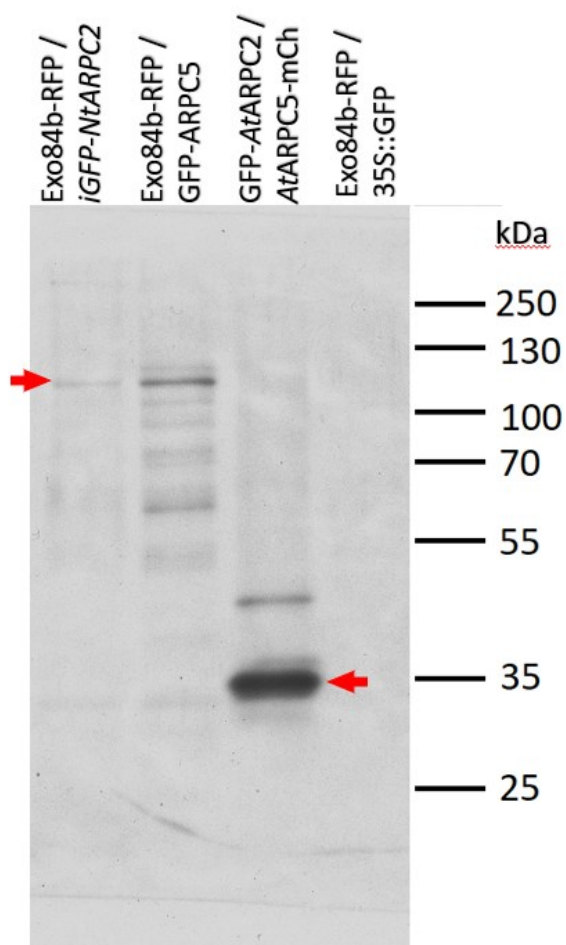
Obrázek 17: WB detekce anti-mCh, (A) cytoplazmatická frakce. (B) frakce s CHAPS solubilizovanými membránovými proteiny. Ani v jednom případě nejsou Rab proteiny detekovány (~50 kDa), AtARPC5-mCh jako pozitivní kontrola ano (~40 kD) (šipka).

6.2.2 KOIMUNOPRECIPITACE PROTEINOVÉHO KOMPLEXU ARP2/3 S EXO84B

Dvojité linie Exo84b-RFP/iGFP-*Nt*ARPC2 (FM076) a Exo84b-RFP/GFP-*At*ARPC5 (FM075) byly použity i pro následné ověření interakce pomocí biochemické analýzy.

Nepodařilo se mi izolovat Exo84b standardním postupem použitým pro podjednotky ARP2/3 (viz kapitola 4.1.9) a musela jsem proto pro GFP-trap použít totální frakci (vynechána druhá centrifugace). Jako pozitivní kontrola byla opět použita linie GFP-*At*ARPC2/*At*ARPC5-mCh, jako negativní tentokrát Exo84b-RFP/35S::GFP (35s::GFP linie ověřená jak mikroskopicky, tak biochemicky, č. databáze F064, viz kapitola ARP2/3).

Detekce WB pomocí anti-mCh protilátky ukázala přítomnost Exo84b-RFP v pull-downu obou ARP2/3 podjednotek. Jak pozitivní, tak negativní kontrola vyšly podle očekávání (Obr. 18).



Obrázek 18: WB detekce, anti-mCh, totální frakce, Exo84b-RFP ~ 110 kDa. AtARPC5-mCh ~ 40 kDa.

7 DISKUZE

7.1 LOKALIZACE KOMPLEXU ARP2/3 V BLÍZKOSTI PM

Pomocí TIRF mikroskopie se nám podařilo vizualizovat signál komplexu ARP2/3 v podobě dynamických teček v blízkosti PM, a cílem této práce bylo tuto novou lokalizaci objasnit. Tyto tečky jsou jiného charakteru než dříve popsané tečky asociující s peroxisomy, tzv. arposomy (Šlajcherová, 2013; Jan Martinek, 2015). Tečky byly pozorovány i v tabákových buňkách BY-2 exprimujících fluorescenčně značené podjednotky komplexu ARP2/3 (nepublikovaná data). Biochemicky ověřené kontrolní linie exprimující volné GFP tečkovitou lokalizaci na membráně nevykazovaly. Linie s těmito konstrukty jsou u nás v laboratoři již dlouho používány, komplementují mutace v příslušných podjednotkách a jsou publikovány (Havelková *et al.*, 2015; Jan Martinek, 2015), tudíž se domníváme, že nově objevená lokalizace je fyziologická.

Umístění a charakter signálu – tečky s omezeným laterálním pohybem zdržující se na PM po dobu 100 ms až 12 s - jsou velmi podobné lokalizaci proteinů účastnících se endo-/exocytotických událostí na PM - TPLATE, dynamin a exocyst (Fujimoto *et al.*, 2010; Fendrych *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2020). TPLATE je podjednotkou komplexu TPLATE, který se jakožto adaptorový komplex účastní časných fází endocytózy závislé na klathrinu (Gadeyne *et al.*, 2014). Konkrétně TPLATE přímo interaguje s podjednotkami klathrinu (Johnson *et al.*, 2020). Komplex TPLATE se také nejspíš pomocí podjednotek AtEH/Pan1 účastní autofagie a vzniku autofagosomu (Wang *et al.*, 2019). V pozdějších fázích endocytózy závislé na klathrinu se objevují proteiny dynaminové rodiny. Tyto GTPázy se podílejí na odškrcení vznikajícího klathrinového váčku (Roux *et al.*, 2006; Konopka, Backues and Bednarek, 2008; Fujimoto *et al.*, 2010). Tečkovitou lokalizaci lze pomocí TIRFM zachytit i u podjednotek komplexu exocyst (Fendrych *et al.*, 2013). Exocyst, jak název napovídá, je proteinový komplex účastnící se exocytózy a zajišťuje prvotní přiblížení sekretorického váčku k PM (Saeed, Brillada and Trujillo, 2019).

Při hledání souvislostí komplexu ARP2/3 a remodelace membrány u rostlin se lze opřít o jiné eukaryotické modely. Úloha komplexu ARP2/3 v endomembránovém systému je dobře prozkoumaná v rámci kvasinkové endocytózy a živočišné exocytózy. V případě endocytózy se komplex vyskytuje přímo na PM, kde dává vznik aktinovým filamentům, která napomáhají tvarovat vznikající endosom a následně jeho internalizaci (Goode, Eskin and Wendland, 2015). U kvasinek je na rozdíl od živočichů účast aktinu na

klathrinem zajišťované endocytóze zásadní. To je vysvětlováno přítomností buněčné stěny u kvasinek a vyššímu turgoru v buňce, který znesnadňuje invaginaci membrány (Basu, Munteanu and Chang, 2014). Přítomnost buněčné stěny u rostlin vede k hledání podobností s kvasinkovou endocytózou. Loňská studie zabývající se na klathrinu závislou endocytózou u rostlin ale ukazuje, že aktin není v místech vznikajících klathrinových váčků přítomen a ani jeho narušení cytoskeletálními inhibitory nijak neovlivňuje vznik klathrinového váčku (Narasimhan *et al.*, 2020). Aktinový cytoskelet byl ale důležitý pro následnou dopravu čerstvě vzniklého váčku do TGN/EE a aktinový cytoskelet se tak nejspíš účastní pozdějších fází endosomálního transportu (Narasimhan *et al.*, 2020). Je nutné se touto problematikou dále zabývat. Jak již bylo řečeno, v případě exocytózy se opíráme o živočišné buňky, které mají doloženou účast ARP2/3 v exocytóze. Aktinová síť zde vzniká kolem sekrečního váčku napomáhá jeho fúzi s PM (Girao, Geli and Idrissi, 2008).

S rozvojem mikroskopických technik se stále zlepšují možnosti pro studium dění na PM. Například pohyb CESA (Cellulose synthase) komplexů po kortikálních mikrotubulech byl dlouho předpokládáný jev, jeho pozorování se ale podařilo až s využitím spinning disk konfokální mikroskopie (Paredes, Somerville and Ehrhardt, 2006). Ta umožňuje oproti klasické LSCM snímání rychlejších jevů a detekci slabších signálů a umožňuje tak zaznamenat i dynamické struktury (Delprato, Merithew and Lambright, 2004). Poměrně novou mikroskopickou technikou ideální ke zkoumání PM a vrstev cytoplazmy k ní přiléhajících je TIRF mikroskopie. Jedná se o typ epifluoresceční mikroskopie, kde dopadá excitační laser na vzorek pod úhlem. Při dosažení určitého úhlu dochází na rozhraní dvou prostředí s různými indexy lomu (krycí sklíčko nebo buněčná stěna/obsah buňky) k totálnímu odrazu laseru a v místě lomu vznikne slabé elektromagnetické záření zvané evanescentní vlna. Nedochází tak k excitaci celého obsahu buňky, ale jen několika málo set nm přiléhajících ke sklíčku a signál v blízkosti PM vynikne (Axelrod, 2016). Velkou výhodou je, že je celá rovina ostrosti snímána najednou a lze pozorovat velmi dynamické jevy. Klasická LSCM je v těchto situacích limitována rychlostí skenování a nehodí se pro snímání rychle se pohybujících struktur.

7.2 MIKROSKOPIE ENDOMEMBRÁNOVÝCH STRUKTUR

Protože nebylo jasné, v jaké části endomembránového systému by Komplex ARP2/3 mohl hrát roli, vybrali jsme několik endomembránových markerů na základě jejich lokalizace uvedené v literatuře a relevance lokalizace pro komplex ARP2/3. Nejprve bylo nutné prozkoumat jejich lokalizaci v kortikální vrstvě a v blízkosti PM a zjistit, zda nepřipomíná kortikální ARP2/3 tečky. Většina markerů nebyla pomocí TIRFM předtím charakterizována a tato pozorování budou užitečná pro další výzkum. Zároveň bylo cílem zjistit, zda je náš postup využívající TIRFM pro tyto účely vhodný.

7.2.1 FYVE

FYVE marker byl již dříve poměrně dobře charakterizován pomocí LSCM v buňkách tabáku BY-2 a značí tonoplast a pozdní endosom (Vermeer *et al.*, 2006). Spojitost mezi komplexem ARP2/3 a FYVE je právě vakuola, jejíž morfologie je u mutantů v ARP2/3 z přesně neznámých příčin změněná (Li *et al.*, 2013; García-González *et al.*, 2020). Pomocí TIRFM se mi podařilo vizualizovat plochu tonoplastu se zrnitým signálem a endosomy menších rozměrů, než jaké lze pozorovat pomocí LSCM. Lokalizaci podobnou dynamickým tečkám v oblasti PM jsem nepozorovala.

Dále jsem se pokoušela kolokalizovat FYVE pozitivní endosomy v TIRFM s jinými endomembránovými markery, které ale měly velmi silný signál o větší vlnové délce a docházelo k přesvécování (bleed-through) signálu do sousedního kanálu a falešně pozitivní kolokalizaci. Toto pozorování demonstuje úskalí spojená s nastavením optické soustavy. Vizualizaci kolokalizaci jsem pak ještě uskutečnila pomocí LSCM a ověřila si, že malé endosomy, které jsem pozorovala předtím pomocí TIRFM, nelze tímto způsobem zachytit. TIRFM tak poprvé umožňuje vidět menší a zároveň velmi dynamické FYVE pozitivní struktury.

7.2.2 VHA-A1

Tento protein je hojně používán jako TGN/EE marker (Viotti *et al.*, 2010; Hutten *et al.*, 2017; Shimizu *et al.*, 2021). a nás zajímal pro svou lokalizaci do časných endosomů (Dettmer 2006). Pomocí TIRFM lze zachytit i dříve nepozorované velmi drobné a dynamické struktury. Jejich charakter není znám. V literatuře zabývající se tímto proteinem je kladen velký důraz na jeho transport pomocí COPII váčků (Viotti, 2013; Lupanga, 2020) Je možné, že drobné struktury jsou COPII váčky naložené VHA-a1 podjednotkou putující z ER na TGN/EE? Rostlinné COPII váčky jsou s průměrem 60 nm velmi malé, což by mohlo odpovídat velikosti pozorovaných drobných struktur (Donohoe, Kang and Staehelin, 2007). Ovšem FL označené plášťové proteiny COPII

váček jsou v LSCM pozorovatelné (Yang *et al.*, 2005; Hanton *et al.*, 2009). Signál VHA-a1 v TIRFM nepřipomíná signál komplexu ARP2/3 v okolí PM. TIRF mikroskopie se opět ukazuje jako velmi vhodný nástroj zobrazování malých a dynamických struktur.

7.2.3 RAB1G

Rab1g podle literatury lokalizuje do recyklujících endosomů (Geldner *et al.*, 2009), jejich funkci u rostlin však zastává TGN/EE. Studií zabývajících se tímto proteinem je ovšem poskrovnu. TIRFM vizualizace ukázala množství různě velkých a různě motilních struktur, často se pohybujících na velké vzdálenosti. Tento typ pohybu připomíná pohyb po aktinu. Mnou provedené ošetření nízkou koncentrací latrunkulinu B nicméně pohyb struktur zásadně neovlivnil. Je pravděpodobné, že vyšší koncentrace toxinu by měla větší efekt. Doprava po aktinu je podpořena i podobností signálu s lokalizací příbuzného proteinu Rab1b, který kolokalizuje s FL značenými aktinovými vlákny a při ošetření buněk 2 μ M lat B došlo k zastavení a agregaci endosomů (Asaoka *et al.*, 2013). Rab1b protein lokalizuje do struktur v blízkosti TGN a má úlohu v transportu mezi TGN a PM (Asaoka, 2013). Struktura signálu Rab1g ARP2/3 tečky nepřipomínala, ale domnívám se, že i zde je TIRFM výjimečně způsobilá pro vizualizaci velmi motilních struktur.

7.2.4 RAB1C

U proteinu Rab1C literatura není příliš obsáhlá. Mnou snímáný marker v TIRFM měl již dříve hlášenou endosomální lokalizaci (Geldner *et al.*, 2009). Já jsem ale pozorovala i hlouběji v cytoplazmě uložené struktury připomínající GA a TGN/EE. Marker měl velmi slabý signál a rozlišení nedovolilo pozorovat struktury ve větším detailu. Možná, že by pozornou selekcí linie šlo dosáhnout rostlin s lepším signálem. Vzhledem k tomu, že většina dobře rozlišitelného signálu se vyskytovala hlouběji v cytoplazmě, nepředpokládám velkou relevanci markeru v mém projektu, kde jsem hledala lokalizaci podobnou ARP2/3, tzv. ARP2/3 tečky.

7.2.5 RABD2A

V literatuře je RabD2a popisován jako marker značící velké množství endomembrán – TGN/EE, GA, post-golgi váčky (Geldner *et al.*, 2009), což je podpořeno i mým pozorováním. RabD2a pozitivní struktury byly různých velikostí a dynamiky. Vzhledem k umístění ARP2/3 teček blíže k PM nás zajímala populace malých a méně motilních endosomů vyskytujících se v této oblasti. Pro objasnění jejich povahy jsem přistoupila k několika farmakologickým ošetřením – latrunkulinem B, BFA a BDM. Lat B ani BFA

motilitu malých endosomů neovlivnily. Vyšší koncentrace BDM způsobila úplné zastavení pohybu malých endosomů. Podobný jev, kdy disrupce aktinu pomocí latrunkulinu B nezpůsobila žádné změny, ale aplikace BDM ano, byl pozorován u transportu skrz plasmodesmy, kde by měl být akto-myozinový komplex činný (Radford and White, 2011). Jedná se možná o ukázkou toho, že různé populace aktinu nemusejí být vždy k určitým disruptorům stejně citlivé. RabD2a byl jediným z Rab proteinů, který se alespoň přiblížil lokalizaci ARP2/3 teček – určité struktury se vyskytovaly v blízkosti PM. RabD2a značí rozsáhlé množství struktur, které jsou pomocí TIRFM dobře zobrazitelné.

7.2.6 Exo84b

Podjednotka komplexu exocyst Exo84b je jediným markerem ze souboru markerů, který byl již dříve v TIRFM vizualizován. Vytváří drobné tečky na PM s omezeným laterálním pohybem a charakteristickou dobou setrvání – tzv. dwelling time (Fendrych *et al.*, 2013), které se podobají signálu ARP2/3 v blízkosti PM, jak již bylo zmíněno výše. Mé pozorování tyto výsledky podpořilo. Exo84b se stal dobrým kandidátem pro protein, který by mohl lokalizovat do stejného kompartmentu jako ARP2/3 u PM.

7.3 VIZUÁLNÍ KOLOKALIZACE DVOJITÝCH LINÍ

Vizuální kolokalizace FL značených Rab proteinů se značenými podjednotkami ARP2/3 pomocí TIRFM nebyla průkazná. GA a TGN/EE se nacházely hlouběji v cytoplazmě mimo výskyt ARP2/3 teček. RabD2a marker se svými drobnými endosomy v blízkosti PM byl nejslibnějším kandidátem, i když charakteristické tečky nebyly pozorovány. V případě Exo84b proteinu, jehož signál připomíná ARP2/3 tečky bylo zjištěno, že spolu malý podíl teček opravdu kolokalizuje. Nabízím dva důvody vysvětlující takto nízkou míru kolokalizace: komplex ARP2/3 může s exocystem interagovat jen ve specifických případech exocytózy, a nekolokalizující tečky jsou účastny jiných PM vázaných událostí; nebo přítomnost tečky nemusí znamenat probíhající exocytózu, struktury mohou být sestaveny na PM, ale exocytóza nakonec z různých důvodů neproběhla, kolokalizace je pak v místech, kde k ní opravdu došlo. Mým úkolem bylo pouze hledat interakce a ne je blíže charakterizovat, do budoucna by bylo pro tyto účely vhodné přistoupit k podrobnější obrazové analýze.

7.4 BIOCHEMICKÉ POTVRZENÍ INTERAKCE

Biochemický přístup byl použit z důvodu, že je ARP2/3 eukaryotických modelů nalézán v endosomu. Nedalo se vyloučit, že komplex ARP2/3 s endosomy v cytoplazmě interaguje, ale tato interakce je pod rozlišovací schopností mikroskopu, například v důsledku příliš malé struktury nebo vysokého fluorescenčního pozadí. Nicméně koimunoprecipitace interakci u markerů RabA1g, RabC1 ani RabD2a neukázala, ale potvrdila ji u proteinu Exo84b. To napovídá, že mikroskopie, která tento výsledek naznačila, je dostatečně spolehlivá metoda zjišťování interakcí. Vzhledem k povaze Rab proteinů jsme pro nalezení jejich interakce s ARP2/3 vyzkoušeli více přístupů. Neaktivní Rab proteiny se nachází volně v cytoplazmě (Araki *et al.*, 1990), proto byla nejprve analyzována cytoplazmatická frakce. Při neprokázání interakce u neaktivních Rab proteinů jsme následně přistoupili k frakci se solubilizovanými proteiny vázanými na membrány. Tato frakce by měla obsahovat i aktivované Rab proteiny (Araki *et al.*, 1990). Ani zde však koimunoprecipitační přístup interakci neprokázal. Není vyloučena možnost vzdálené interakce ARP2/3 s Rab proteiny. Tato skutečnost by se dala ověřit analýzou dynamiky Rab pozitivních endomembrán v rostlinách s mutantním pozadím. V rámci práce jsem křížením vytvořila i tyto linie a pro vyhodnocení v TIRFM je zapotřebí kvalitní obrazové analýzy.

Jako pozitivní kontrola pro koimunoprecipitaci byla použita dvojité linie exprimující ARPC2-GFP a mCherry-ARPC5 podjednotky komplexu ARP2/3. V tomto experimentu byl vždy mCherry-ARPC5 detekován ve frakci proteinů vázajících ARPC2-GFP, což potvrzuje, že obě FL-značené podjednotky jsou schopné interakce v komplexu.

7.5 ARP2/3 INTERAGUJE S EXO84B

Fenotypy mutací komplexu ARP2/3 jako jsou deformované trichomy, změny ve složení buněčné naznačují funkci komplexu v budování buněčné stěny. Z tohoto důvodu je kolokalizace ARP2/3 s markerem pro exocytózu logická.

Složky buněčné stěny jsou u rostlin deponovány různými způsoby. Celulóza je syntetizována přímo na PM CESA komplexy a podél kotikálních mikrotubulů ukládána do buněčné stěny (Arioli *et al.*, 1998; Scheible *et al.*, 2001; Paredez, Somerville and Ehrhardt, 2006). CESA komplexy jsou podle předpokladů skládány v GA, odkud se na PM dostávají váčkovým transportem (Zhang *et al.*, 2016). CESA komplex je aktivní pouze na PM a jedním z regulačních mechanismů je jeho internalizace z PM

a recyklace na PM za využití tzv. malých CESA -obsahujících kompartmentů (small CESA-containing compartments, SmaCCs) (Crowell *et al.*, 2009; Gutierrez *et al.*, 2009). Tohoto procesu se účastní endocytotický aparát, včetně TPLATE komplexu (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018). Kalóza vzniká podobně pomocí kalóza-syntáz (Verma and Hong, 2001). Přesný způsob, jakým jsou do buněčné stěny ukládány další složky jako jsou hemicelulózy a pektiny není dostatečně objasněn (Anderson, 2020). Vznik těchto polysacharidů se odehrává v GA -molekuly jsou postupně syntetizovány během průchodu od cis oblastí GA až k trans-cisternám. Po té jsou z TGN dopravovány váčky k povrchu buňky. Přesné okolnosti a specifita nakládání, dopravy a exocytózy tohoto transportu jsou stále otázkou (Driouich 2012, Anderson 2020).

Biochemická analýza ukázala koimunoprecipitaci Exo84b s ARPC2 i s ARPC5 podjednotkami. Tato souvislost by mohla podkrýt funkci komplexu ARP2/3 v endomembránové remodelaci související s dopravou složek buněčné stěny k PM. U *exo84b* mutanty byla pozorovaná akumulace váčků v cytoplazmě nesoucích vláknitý náklad – dost možná právě pektiny či hemicelulózy (Fendrych *et al.*, 2010). Právě tyto dvě složky buněčné stěny jsou u mutantů komplexu ARP2/3 ovlivněny (Sahi *et al.*, 2018)

Jedná se o první takový doklad u rostlin, u živočišných buněk byla interakce komplexu ARP2/3 a jeho aktivátorů s exocystem doložena již dříve (Zuo *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2012). ARP2/3 interagoval s exocystem v rámci pohybu buněk pomocí cytoplazmatických výběžků poháněných aktinovou nukleací (Liu *et al.*, 2009). To je jev velmi vzdálený sesilním rostlinným buňkám, každopádně ukazuje souvislosti mezi remodelací membrán pomocí ARP2/3 - nukleovaného aktinu a sekreční dráhou.

8 ZÁVĚRY

1. Pomocí TIRF mikroskopie byla odhalena nová lokalizace fluorescenčně značených podjednotek komplexu ARP2/3 GFP-*At*ARPC2, iGFP-*Nt*ARPC2 a GFP-*At*ARPC5 v podobě dynamických teček v blízkosti plazmatické membrány.
2. TIRFM byla použita pro charakterizaci endomembránových proteinů vybraných na základě jejich potenciálu objasnit původ ARP2/3 teček. U všech markerových proteinů - FYVE domény, VHA-a1, RabA1g, RabC1 a RabD2a, bylo ukázáno, že lze touto mikroskopickou technikou zobrazovat malé a dynamické struktury, které běžná LSCM nezachytí. Žádný z těchto markerů nevykazoval v okolí plazmatické membrány lokalizaci signálu připomínající ARP2/3. Jako marker endocytózy byl využit protein Exo84b, který se jako podjednotka komplexu exocyst účastní exocytotických událostí na PM. Jeho lokalizace na plazmatické membráně velmi připomínala lokalizaci ARP2/3.
3. Dále byla zjišťována interakce proteinového komplexu ARP2/3 s některými z těchto podjednotek pomocí vizuální kolokalizace v TIRFM. Žádný z Rab proteinů s ARP2/3 výrazněji nekolokalizoval. Byla ale pozorována malá míra kolokalizace podjednotek komplexu ARP2/3 s Exo84b proteinem. Tato interakce byla potvrzena biochemickým přístupem koimunoprecipitace. Jako negativní kontrola byly využity Rab proteiny, kde nebyla interakce tímto způsobem opět nalezena. Jako pozitivní kontrola byl využit rostlinný materiál exprimující dvě podjednotky komplexu ARP2/3, kde byla pomocí koimunoprecipitace potvrzena interakce.

9 POUŽITÁ LITERATURA

- Amann, K. J. and Pollard, T. D. (2001) 'The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments', *Nature Cell Biology*, 3(3), pp. 306–310. doi: 10.1038/35060104.
- Araki, S. *et al.* (1990) 'Regulation of reversible binding of smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein, to synaptic plasma membranes and vesicles by its specific regulatory protein, GDP dissociation inhibitor', *Journal of Biological Chemistry*, 265(22), pp. 13007–13015. doi: 10.1016/s0021-9258(19)38260-2.
- Arioli, T. *et al.* (1998) 'Molecular analysis of cellulose biosynthesis in Arabidopsis', *Science*, 279(5351), pp. 717–720. doi: 10.1126/science.279.5351.717.
- Asaoka, R. *et al.* (2013) 'Arabidopsis RABA1 GTPases are involved in transport between the trans-Golgi network and the plasma membrane, and are required for salinity stress tolerance', *Plant Journal*, 73(2), pp. 240–249. doi: 10.1111/tbj.12023.
- Axelrod, D. (2016) 'Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy', *Encyclopedia of Cell Biology*, 2(2), pp. 62–69. doi: 10.1016/B978-0-12-394447-4.20089-8.
- Balzer, C. J. *et al.* (2019) 'Single-Turnover Activation of Arp2/3 Complex by Dip1 May Balance Nucleation of Linear versus Branched Actin Filaments', *Current Biology*, 29(19), pp. 3331-3338.e7. doi: 10.1016/j.cub.2019.08.023.
- Basu, R. and Chang, F. (2011) 'Characterization of dip1p reveals a switch in Arp2/3-dependent actin assembly for fission yeast endocytosis', *Current Biology*. Elsevier Ltd, 21(11), pp. 905–916. doi: 10.1016/j.cub.2011.04.047.
- Basu, R., Munteanu, E. L. and Chang, F. (2014) 'Role of turgor pressure in endocytosis in fission yeast', *Molecular Biology of the Cell*, 25(5), pp. 679–687. doi: 10.1091/mbc.E13-10-0618.
- Batoko, H. *et al.* (2000) 'A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants', *Plant Cell*, 12(11), pp. 2201–2217. doi: 10.1105/tpc.12.11.2201.
- Boyd, C. *et al.* (2004) 'Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p', *Journal of Cell Biology*, 167(5), pp. 889–901. doi: 10.1083/jcb.200408124.
- Cabrera, R. *et al.* (2011) 'Schizosaccharomyces pombe Arc3 is a conserved subunit of the Arp2/3 complex required for polarity, actin organization, and endocytosis', *Yeast*, 28(6), pp. 495–503. doi: 10.1002/yea.1853.Schizosaccharomyces.
- Carnell, M. *et al.* (2011) 'Actin polymerization driven by WASH causes V-ATPase retrieval and vesicle neutralization before exocytosis', *Journal of Cell Biology*, 193(5), pp. 831–839. doi: 10.1083/jcb.201009119.
- Crowell, E. F. *et al.* (2009) 'Pausing of golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in Arabidopsis', *Plant Cell*, 21(4), pp. 1141–1154. doi: 10.1105/tpc.108.065334.
- Deeks, M. J. *et al.* (2004) 'Arabidopsis NAP1 Is Essential for Arp2/3-Dependent Trichome Morphogenesis', *Current Biology*, 14, pp. 1410–1414. doi: 10.1016/j.
- Delprato, A., Merithew, E. and Lambright, D. G. (2004) 'Structure, exchange determinants, and family-

wide Rab specificity of the tandem helical bundle and Vps9 domains of Rabex-5', *Cell*, 118(5), pp. 607–617. doi: 10.1016/j.cell.2004.08.009.

Dettmer, J. *et al.* (2006) 'Vacuolar H⁺-ATPase Activity Is Required for Endocytic and Secretory Trafficking in Arabidopsis', *The Plant Cell*, 18(March), pp. 715–730. doi: 10.1105/tpc.105.037978.null.

Dietz, K. J. *et al.* (2001) 'Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level', *Journal of Experimental Botany*, 52(363), pp. 1969–1980. doi: 10.1093/jexbot/52.363.1969.

Djakovic, S. *et al.* (2006) 'BRICK 1/HSPC300 functions with SCAR and the ARP2/3 complex to regulate epidermal cell shape in Arabidopsis', *Development*, 133(6), pp. 1091–1100. doi: 10.1242/dev.02280.

Donohoe, B. S., Kang, B. H. and Staehelin, L. A. (2007) 'Identification and characterization of COPIa- and COPIb-type vesicle classes associated with plant and algal Golgi', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(1), pp. 163–168. doi: 10.1073/pnas.0609818104.

Drakakaki, G. *et al.* (2012) 'Isolation and proteomic analysis of the SYP61 compartment reveal its role in exocytic trafficking in Arabidopsis', *Cell Research*, 22(2), pp. 413–424. doi: 10.1038/cr.2011.129.

Duncan, M. C. *et al.* (2001) 'Yeast Eps15-like endocytic protein, Pan1p, activates the Arp2/3 complex', *Nature Cell Biology*, 3(7), pp. 687–690. doi: 10.1038/35083087.

Elias, M. *et al.* (2003) 'The exocyst complex in plants', *Cell Biology International*, 27(3), pp. 199–201. doi: 10.1016/S1065-6995(02)00349-9.

Fendrych, M. *et al.* (2010) 'The Arabidopsis exocyst complex is involved in cytokinesis and cell plate maturation', *Plant Cell*, 22(9), pp. 3053–3065. doi: 10.1105/tpc.110.074351.

Fendrych, M. *et al.* (2013) 'Visualization of the exocyst complex dynamics at the plasma membrane of Arabidopsis thaliana', *Molecular Biology of the Cell*, 24(4), pp. 510–520. doi: 10.1091/mbc.E12-06-0492.

Fujimoto, L. M. *et al.* (2000) 'Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells', *Traffic*, 1(2), pp. 161–171. doi: 10.1034/j.1600-0854.2000.010208.x.

Fujimoto, M. *et al.* (2010) 'Arabidopsis dynamin-related proteins DRP2B and DRP1A participate together in clathrin-coated vesicle formation during endocytosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(13), pp. 6094–6099. doi: 10.1073/pnas.0913562107.

Gadeyne, A. *et al.* (2014) 'The TPLATE adaptor complex drives clathrin-mediated endocytosis in plants', *Cell*, 156(4), pp. 691–704. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.039.

Galletta, B. J., Chuang, D. Y. and Cooper, J. A. (2008) 'Distinct roles for Arp2/3 regulators in actin assembly and endocytosis', *PLoS Biology*, 6(1), pp. 0072–0085. doi: 10.1371/journal.pbio.0060001.

Galletta, B. J., Mooren, O. L. and Cooper, J. A. (2010) 'Actin dynamics and endocytosis in yeast and mammals', *Curr Opin Biotechnol.*, 21(5), pp. 604–610. doi: 10.1016/j.copbio.2010.06.006.Actin.

García-González, J. *et al.* (2020) 'Arp2/3 Complex Is Required for Auxin-Driven Cell Expansion Through Regulation of Auxin Transporter Homeostasis', *Frontiers in Plant Science*, 11(April), pp. 1–15. doi: 10.3389/fpls.2020.00486.

Geldner, N. *et al.* (2009) 'Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a

- multicolor marker set', *Plant Journal*, 59(1), pp. 169–178. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03851.x.
- Girao, H., Geli, M. I. and Idrissi, F. Z. (2008) 'Actin in the endocytic pathway: From yeast to mammals', *FEBS Letters*, 582(14), pp. 2112–2119. doi: 10.1016/j.febslet.2008.04.011.
- Goode, B. L. *et al.* (2001) 'Activation of the Arp2/3 complex by the actin filament binding protein Abp1p', *Journal of Cell Biology*, 152(3), pp. 627–634. doi: 10.1083/jcb.153.3.627.
- Goode, B. L., Eskin, J. A. and Wendland, B. (2015) 'Actin and endocytosis in budding yeast', *Genetics*, 199(2), pp. 315–358. doi: 10.1534/genetics.112.145540.
- Guo, W. *et al.* (1999) 'The exocyst is an effector for Sec4P, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis', *EMBO Journal*, 18(4), pp. 1071–1080. doi: 10.1093/emboj/18.4.1071.
- Guo, W., Grant, A. and Novick, P. (1999) 'Exo84p is an exocyst protein essential for secretion', *Journal of Biological Chemistry*, 274(33), pp. 23558–23564. doi: 10.1074/jbc.274.33.23558.
- Gutierrez, R. *et al.* (2009) 'Arabidopsis cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments', *Nature Cell Biology*, 11(7), pp. 797–806. doi: 10.1038/ncb1886.
- Hála, M. *et al.* (2008) 'An exocyst complex functions in plant cell growth in Arabidopsis and tobacco', *Plant Cell*, 20(5), pp. 1330–1345. doi: 10.1105/tpc.108.059105.
- Hanton, S. L. *et al.* (2009) 'Dynamic organization of COPII coat proteins at endoplasmic reticulum export sites in plant cells', *Plant Journal*, 57(6), pp. 963–974. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03740.x.
- Havelková, L. *et al.* (2015) 'Arp2/3 complex subunit ARPC2 binds to microtubules', *Plant Science*, 241, pp. 96–108. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.10.001.
- Heard, W. *et al.* (2015) 'Identification of regulatory and cargo proteins of endosomal and secretory pathways in arabidopsis thaliana by proteomic dissection', *Molecular and Cellular Proteomics*, 14(7), pp. 1796–1813. doi: 10.1074/mcp.M115.050286.
- Heider, M. R. *et al.* (2016) 'Subunit connectivity, assembly determinants, and architecture of the yeast exocyst complex Margaret', *Nat Struct Mol Biol*, 23(1), pp. 59–66. doi: 10.1038/nsmb.3146.Subunit.
- Herman, E. M. *et al.* (1994) 'Vacuolar-type H⁺-ATPases are associated with the endoplasmic reticulum and provacuoles of root tip cells', *Plant Physiology*, 106(4), pp. 1313–1324. doi: 10.1104/pp.106.4.1313.
- Hoshi, H. O. *et al.* (2016) 'A Wiskott-Aldrich syndrome protein is involved in endocytosis in *Aspergillus nidulans*', *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. Taylor & Francis, 80(9), pp. 1802–1812. doi: 10.1080/09168451.2016.1148580.
- Hutten, S. J. *et al.* (2017) 'Visualization of BRI1 and SERK3/BAK1 nanoclusters in Arabidopsis roots', *PLoS ONE*, 12(1), pp. 1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0169905.
- Insall, R. *et al.* (2001) 'Dynamics of the Dictyostelium Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis', *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 50(3), pp. 115–128. doi: 10.1002/cm.10005.
- Jan Martinek (2015) *Vizualizace a analýza distribuce komplexu ARP2/3 v rostlinách*.
- Jensen, R. B. *et al.* (2001) 'FYVE zinc-finger proteins in the plant model Arabidopsis thaliana: Identification of PtdIns3P-binding residues by comparison of classic and variant FYVE domains',

Biochemical Journal, 359(1), pp. 165–173. doi: 10.1042/0264-6021:3590165.

Johnson, A. *et al.* (2020) 'Experimental toolbox for quantitative evaluation of clathrin-mediated endocytosis in the plant model *Arabidopsis*', *Journal of cell science*, 133(15). doi: 10.1242/jcs.248062.

Jones, D. S. *et al.* (2018) 'Cellular distribution of secretory pathway markers in the haploid synergid cells of *Arabidopsis thaliana*', *Plant Journal*, 94(1), pp. 192–202. doi: 10.1111/tpj.13848.

Jones, S. *et al.* (1995) 'Requirement of nucleotide exchange factor for Ypt1 GTPase mediated protein transport', *Journal of Cell Biology*, 130(5), pp. 1051–1061. doi: 10.1083/jcb.130.5.1051.

Kaksonen, M. and Roux, A. (2018) 'Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 19(5), pp. 313–326. doi: 10.1038/nrm.2017.132.

Kelleher, J. F., Atkinson, S. J. and Pollard, T. D. (1995) 'Sequences, Structural Models, and Cellular Localization of the Actin-related Proteins Arp2 and Arp3 from', *The Journal of cell biology*, 131(2), pp. 385–397. doi: 10.1083/jcb.131.2.385.

Kollmar, M., Lbik, D. and Enge, S. (2012) 'Evolution of the eukaryotic ARP2/3 activators of the WASP family: WASP, WAVE, WASH, and WHAMM, and the proposed new family members WAWH and WAML', *BMC Research Notes*, 5. doi: 10.1186/1756-0500-5-88.

Konopka, C. A., Backues, S. K. and Bednarek, S. Y. (2008) 'Dynamics of *Arabidopsis* dynamin-related protein 1C and a clathrin light chain at the plasma membrane', *Plant Cell*, 20(5), pp. 1363–1380. doi: 10.1105/tpc.108.059428.

Kotchoni, S. O. *et al.* (2009) 'The association of the *Arabidopsis* actin-related protein2/3 complex with cell membranes is linked to its assembly status but not its activation', *Plant Physiology*, 151(4), pp. 2095–2109. doi: 10.1104/pp.109.143859.

Koumandou, V. L. *et al.* (2007) 'Control systems for membrane fusion in the ancestral eukaryote; Evolution of tethering complexes and SM proteins', *BMC Evolutionary Biology*, 7, pp. 1–17. doi: 10.1186/1471-2148-7-29.

Kubátová, Z. *et al.* (2019) '*Arabidopsis* trichome contains two plasma membrane domains with different lipid compositions which attract distinct EXO70 subunits', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15). doi: 10.3390/ijms20153803.

Lamaze, C. *et al.* (1997) 'The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells', *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), pp. 20332–20335. doi: 10.1074/jbc.272.33.20332.

Lee, J. A. *et al.* (2016) 'Functional Genomic Analysis of *Candida albicans* Adherence Reveals a Key Role for the Arp2/3 Complex in Cell Wall Remodelling and Biofilm Formation', *PLoS Genetics*, 12(11), pp. 1–24. doi: 10.1371/journal.pgen.1006452.

Li, L. J. *et al.* (2013) 'The reorganization of actin filaments is required for vacuolar fusion of guard cells during stomatal opening in *Arabidopsis*', *Plant, Cell and Environment*, 36(2), pp. 484–497. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02592.x.

Li, S. *et al.* (2003) 'The putative *Arabidopsis* Arp2/3 complex controls leaf cell morphogenesis', *Plant Physiology*, 132(4), pp. 2034–2044. doi: 10.1104/pp.103.028563.

- Liu, J. *et al.* (2009) 'The Role of the Exocyst in Matrix Metalloproteinase Secretion and Actin Dynamics during Tumor Cell Invadopodia Formation', *Molecular biology of the cell*, 20, pp. 3763–3771. doi: 10.1091/mbc.E08.
- Liu, J. *et al.* (2012) 'Exo70 stimulates the Arp2/3 complex for lamellipodia formation and directional cell migration', *Current Biology*, 22(16), pp. 1510–1515. doi: 10.1016/j.cub.2012.05.055.
- Lodish, H. *et al.* (2008) '17. Vesicular Traffic, Secretion, and Endocytosis', in *Molecular Cell Biology*. 5th edn. W. H. Freeman.
- Luo, G. *et al.* (2018) 'Cryo-EM Structure of the Exocyst Complex built the atomic model', *Nat Struct Mol Biol*, 25(2), pp. 139–146. doi: 10.1038/s41594-017-0016-2.Cryo-EM.
- Ma, W. *et al.* (2020) 'Arp2/3 nucleates F-actin coating of fusing insulin granules in pancreatic β cells to control insulin secretion', *Journal of cell science*, 133(6). doi: 10.1242/jcs.236794.
- Machesky, L. M. *et al.* (1994) 'Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose', *Journal of Cell Biology*, 127(1), pp. 107–115. doi: 10.1083/jcb.127.1.107.
- Madania, A. *et al.* (1999) 'The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of human Wiskott-Aldrich Syndrome protein Las17p interacts with the Arp2/3 complex', *Molecular Biology of the Cell*, 10(10), pp. 3521–3538. doi: 10.1091/mbc.10.10.3521.
- Marek, M., Vincenzetti, V. and Martin, S. G. (2020) 'Sterol biosensor reveals LAM-family Ltc1-dependent sterol flow to endosomes upon Arp2/3 inhibition', *The Journal of cell biology*, 219(6). doi: 10.1083/jcb.202001147.
- Mathur, J. *et al.* (2003) 'Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in *Arabidopsis*', *Plant Cell*, 15(7), pp. 1632–1645. doi: 10.1105/tpc.011676.
- Matsuoka, K. *et al.* (1997) 'A vacuolar-type H⁺-ATPase in a nonvacuolar organelle is required for the sorting of soluble vacuolar protein precursors in tobacco cells', *Plant Cell*, 9(4), pp. 533–546. doi: 10.1105/tpc.9.4.533.
- Merrifield, C. J. *et al.* (2004) 'Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp 2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts', *European Journal of Cell Biology*, 83(1), pp. 13–18. doi: 10.1078/0171-9335-00356.
- Merrifield, C. J., Perrais, D. and Zenisek, D. (2005) 'Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells', *Cell*. Elsevier Inc., 121(4), pp. 593–606. doi: 10.1016/j.cell.2005.03.015.
- Mooren, O. L., Galletta, B. J. and Cooper, J. A. (2012) 'Roles for actin assembly in endocytosis', *Annual Review of Biochemistry*, 81, pp. 661–686. doi: 10.1146/annurev-biochem-060910-094416.
- Moreau, V. *et al.* (1996) 'The *Saccharomyces cerevisiae* actin-related protein Arp2 is involved in the actin cytoskeleton', *Journal of Cell Biology*, 134(1), pp. 117–132. doi: 10.1083/jcb.134.1.117.
- Moreau, V. *et al.* (1997) 'The Yeast Actin-related Protein Arp2p Is Required for the Internalization Step of Endocytosis', *Molecular Biology of the Cell*, 8(July), pp. 1361–1375.
- Muneer, S. *et al.* (2018) 'Proteomic analysis reveals the dynamic role of silicon in alleviation of

hyperhydricity in carnation grown in vitro', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). doi: 10.3390/ijms19010050.

Mylvaganam, S., Freeman, S. A. and Grinstein, S. (2021) 'The cytoskeleton in phagocytosis and macropinocytosis', *Current Biology*. Elsevier Inc., 31(10), pp. R619–R632. doi: 10.1016/j.cub.2021.01.036.

Narasimhan, M. *et al.* (2020) 'Evolutionarily unique mechanistic framework of clathrin-mediated endocytosis in plants', *eLife*, 9, pp. 1–30. doi: 10.7554/eLife.52067.

Nelson, B. K., Cai, X. and Nebenführ, A. (2007) 'A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants', *Plant Journal*, 51(6), pp. 1126–1136. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03212.x.

Papalazarou, V. and Machesky, L. M. (2021) 'The cell pushes back: The Arp2/3 complex is a key orchestrator of cellular responses to environmental forces', *Current Opinion in Cell Biology*, 68, pp. 37–44. doi: 10.1016/j.ceb.2020.08.012.

Paredes, A. R., Somerville, C. R. and Ehrhardt, D. W. (2006) 'Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules', *Science*, 312(5779), pp. 1491–1495. doi: 10.1126/science.1126551.

Pečenková, T. *et al.* (2011) 'The role for the exocyst complex subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the plant-pathogen interaction', *Journal of Experimental Botany*, 62(6), pp. 2107–2116. doi: 10.1093/jxb/erq402.

Pereira-Leal, J. B. and Seabra, M. C. (2001) 'Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins', *Journal of Molecular Biology*, 313(4), pp. 889–901. doi: 10.1006/jmbi.2001.5072.

Pinheiro, H. *et al.* (2009) 'Genetic evidence that the higher plant Rab-D1 and Rab-D2 GTPases exhibit distinct but overlapping interactions in the early secretory pathway', *Journal of Cell Science*, 122(20), pp. 3749–3758. doi: 10.1242/jcs.050625.

Pollard, T. D. and Borisy, G. G. (2003) 'Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments', *Cell*, 112, pp. 453–465. doi: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00120-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00120-x).

Radford, J. E. and White, R. G. (2011) 'Inhibitors of myosin, but not actin, alter transport through Tradescantia plasmodesmata', *Protoplasma*, 248(1), pp. 205–216. doi: 10.1007/s00709-010-0244-3.

Rea, P. A. and Sanders, D. (1987) 'Tonoplast energization: Two H⁺ pumps, one membrane', *Physiologia Plantarum*, 71(1), pp. 131–141. doi: 10.1111/j.1399-3054.1987.tb04630.x.

Regazzi, R. *et al.* (1992) 'The small GTP-binding proteins in the cytosol of insulin-secreting cells are complexed to GDP dissociation inhibitor proteins', *Journal of Biological Chemistry*. © 1992 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 267(25), pp. 17512–17519. doi: 10.1016/s0021-9258(19)37072-3.

Reyes, F. C., Buono, R. and Otegui, M. S. (2011) 'Plant endosomal trafficking pathways', *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, 14(6), pp. 666–673. doi: 10.1016/j.pbi.2011.07.009.

Robertson, A. S. *et al.* (2009) 'The WASP Homologue Las17 Activates the Novel Actin-regulatory Activity of Ysc84 to Promote Endocytosis in Yeast', *Molecular biology of the cell*, 20(16), pp. 1618–1628. doi: <https://dx.doi.org/10.1091%2Fmbc.E08-09-0982>.

- Rotty, J. D., Wu, C. and Bear, J. E. (2013) 'New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Nature Publishing Group, 14(1), pp. 7–12. doi: 10.1038/nrm3492.
- Rouiller, I. *et al.* (2008) 'The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex', *Journal of Cell Biology*, 180(5), pp. 887–895. doi: 10.1083/jcb.200709092.
- Roux, A. *et al.* (2006) 'GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission', *Nature*, 441(7092), pp. 528–531. doi: 10.1038/nature04718.
- Rutherford, S. and Moore, I. (2002) 'The Arabidopsis Rab GTPase family: Another enigma variation', *Current Opinion in Plant Biology*, 5(6), pp. 518–528. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00307-2.
- Saeed, B., Brillada, C. and Trujillo, M. (2019) 'Dissecting the plant exocyst', *Current Opinion in Plant Biology*, 52, pp. 69–76. doi: 10.1016/j.pbi.2019.08.004.
- Sahi, V. P. *et al.* (2018) 'Arabidopsis thaliana plants lacking the ARP2/3 complex show defects in cell wall assembly and auxin distribution', *Annals of Botany*, 122(5), pp. 777–789. doi: 10.1093/aob/mcx178.
- Saint-Jore, C. M. *et al.* (2002) 'Redistribution of membrane proteins between the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum in plants is reversible and not dependent on cytoskeletal networks', *Plant Journal*, 29(5), pp. 661–678. doi: 10.1046/j.0960-7412.2002.01252.x.
- Salisbury, J. L., Condeelis, J. S. and Satir, P. (1980) 'Role of coated vesicles, microfilaments, and calmodulin in receptor-mediated endocytosis by cultured B lymphoblastoid cells', *Journal of Cell Biology*, 87(1), pp. 132–141. doi: 10.1083/jcb.87.1.132.
- Sánchez-Rodríguez, C. *et al.* (2018) 'The Cellulose Synthases Are Cargo of the TPLATE Adaptor Complex', *Molecular Plant*, 11(2), pp. 346–349. doi: 10.1016/j.molp.2017.11.012.
- Sawa, M. *et al.* (2003) 'Essential role of the C. elegans Arp2/3 complex in cell migration during ventral enclosure', *Journal of Cell Science*, 116(8), pp. 1505–1518. doi: 10.1242/jcs.00362.
- Scheible, W. R. *et al.* (2001) 'Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in Arabidopsis lxr1 mutants', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), pp. 10079–10084. doi: 10.1073/pnas.191361598.
- Semba, S. *et al.* (2006) 'Coexpression of actin-related protein 2 and Wiskott-Aldrich syndrome family verproline-homologous protein 2 in adenocarcinoma of the lung', *Clinical Cancer Research*, 12(8), pp. 2449–2454. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2566.
- Sena, F. *et al.* (2017) 'Spectral phasor analysis reveals altered membrane order and function of root hair cells in Arabidopsis dry2/sqe1-5 drought hypersensitive mutant', *Plant Physiology and Biochemistry*, 119, pp. 224–231. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.08.017.
- Shimizu, Y. *et al.* (2021) 'Cargo sorting zones in the trans-Golgi network visualized by super-resolution confocal live imaging microscopy in plants', *Nature Communications*, 12(1). doi: 10.1038/s41467-021-22267-0.
- Shivas, J. M. and Skop, A. R. (2012) 'Arp2/3 mediates early endosome dynamics necessary for the maintenance of PAR asymmetry in Caenorhabditis elegans', *Molecular Biology of the Cell*, 23(10), pp. 1917–1927. doi: 10.1091/mbc.E12-01-0006.

ŠlajcheroVá, B. K. (2013) *Lokalizace proteinu ARPC2 v rostlinné buňce*.

Soldati, T. *et al.* (1994) 'Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange', *Nature*, 369(6475), pp. 76–78. doi: 10.1038/369076a0.

Song, S. K. *et al.* (2020) 'Defective Quiescent Center/AtTRS85 Encoding a TRAPPIII-specific Subunit Required for the Trans-golgi Network/Early Endosome Integrity is Essential for the Proper Root Development in Arabidopsis', *Journal of Plant Biology*, 63(1), pp. 23–31. doi: 10.1007/s12374-020-09234-w.

Stefano, G. *et al.* (2015) 'ER network homeostasis is critical for plant endosome streaming and endocytosis', *Cell Discovery*, 1(15033). doi: 10.1038/celldisc.2015.33.

Stenmark, H. *et al.* (1996) 'Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger', *Journal of Biological Chemistry*. © 1996 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 271(39), pp. 24048–24054. doi: 10.1074/jbc.271.39.24048.

Stenmark, H. (2009) 'Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(8), pp. 513–525. doi: 10.1038/nrm2728.

Strom, M. *et al.* (1993) 'A yeast GTPase-activating protein that interacts specifically with a member of the Ypt/Rab family', *Nature*, 361(6414), pp. 736–739. doi: 10.1038/361736a0.

Sze, H. *et al.* (2002) 'A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H⁺-ATPase', *Trends in Plant Science*, 7(4), pp. 157–161. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02240-9.

TerBush, D. R. *et al.* (1996) 'The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*', *EMBO Journal*, 15(23), pp. 6483–6494. doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb01039.x.

Thrasher, A. J. (2009) 'New insights into the biology of Wiskott-Aldrich syndrome (WAS)', *American society of Hematology*, pp. 132–138. doi: 10.1182/asheducation-2009.1.132.

Toshima, J. *et al.* (2005) 'Phosphoregulation of Arp2/3-dependent actin assembly during receptor-mediated endocytosis', *Nature Cell Biology*, 7(3), pp. 246–254. doi: 10.1038/ncb1229.

Tran, D. T. *et al.* (2015) 'Arp2/3-mediated F-actin formation controls regulated exocytosis in vivo', *Nature Communications*, 6. doi: 10.1038/ncomms10098.

Ueda, T. *et al.* (2001) 'Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*', *EMBO Journal*, 20(17), pp. 4730–4741. doi: 10.1093/emboj/20.17.4730.

Ullrich, O. *et al.* (1993) 'Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins', *Journal of Biological Chemistry*, 268(24), pp. 18143–18150. doi: 10.1016/s0021-9258(17)46822-0.

Verma, D. P. S. and Hong, Z. (2001) 'Plant callose synthase complexes', *Plant Molecular Biology*, 47(6), pp. 693–701. doi: 10.1023/A:1013679111111.

Vermeer, J. E. M. *et al.* (2006) 'Visualization of PtdIns3P dynamics in living plant cells', *Plant Journal*, 47(5), pp. 687–700. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02830.x.

Viotti, C. *et al.* (2010) 'Endocytic and secretory traffic in Arabidopsis merge in the trans-golgi network/early

- endosome, an independent and highly dynamic organelle', *Plant Cell*, 22(4), pp. 1344–1357. doi: 10.1105/tpc.109.072637.
- Voigt, B. *et al.* (2005) 'GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of Arabidopsis seedlings', *European Journal of Cell Biology*, 84(6), pp. 595–608. doi: 10.1016/j.ejcb.2004.11.011.
- Vukašinović, N. *et al.* (2017) 'Microtubule-dependent targeting of the exocyst complex is necessary for xylem development in Arabidopsis', *New Phytologist*, 213(3), pp. 1052–1067. doi: 10.1111/nph.14267.
- Wagner, A. R. *et al.* (2013) 'Dip1 defines a class of Arp2/3 complex activators that function without preformed actin filaments', *Current Biology*, 23(20), pp. 1990–1998. doi: 10.1016/j.cub.2013.08.029.
- Wang, P. *et al.* (2016) 'Arabidopsis NAP1 Regulates the Formation of Autophagosomes', *Current Biology*, 26(15), pp. 2060–2069. doi: 10.1016/j.cub.2016.06.008.
- Wang, P. *et al.* (2019) 'Plant AtEH/Pan1 proteins drive autophagosome formation at ER-PM contact sites with actin and endocytic machinery', *Nature Communications*, 10(1), pp. 1–16. doi: 10.1038/s41467-019-12782-6.
- Watanabe, N., Nakada-Tsukui, K. and Nozaki, T. (2020) 'Two isotypes of phosphatidylinositol 3 - phosphate - binding sorting nexins play distinct roles in trogocytosis in *Entamoeba histolytica*', *Cellular and Molecular Life Sciences*, (22), pp. 1–16. doi: 10.1111/cmi.13144.
- Wayne, R. (2009) *Plant Cell Biology*. 1st edn. Academic Press.
- Welch, M. D. and Mullins, R. D. (2002) 'Cellular control of actin nucleation', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18, pp. 247–288. doi: 10.1146/annurev.cellbio.18.040202.112133.
- Wendland, B. *et al.* (1996) 'A novel fluorescence-activated cell sorter-based screen for yeast endocytosis mutants identifies a yeast homologue of mammalian eps15', *Journal of Cell Biology*, 135(6), pp. 1485–1500. doi: 10.1083/jcb.135.6.1485.
- Wu, B. and Guo, W. (2015) 'The exocyst at a glance', *Journal of Cell Science*, 128(15), pp. 2957–2964. doi: 10.1242/jcs.156398.
- Wu, S. *et al.* (2005) 'Sec15 interacts with Rab11 via a novel domain and affects Rab11 localization in vivo', *Nature Structural and Molecular Biology*, 12(10), pp. 879–885. doi: 10.1038/nsmb987.
- Yang, Y. D. *et al.* (2005) 'Dynamics of COPII vesicles and the Golgi apparatus in cultured *Nicotiana tabacum* BY-2 cells provides evidence for transient association of Golgi stacks with endoplasmic reticulum exit sites', *Plant Cell*, 17(5), pp. 1513–1531. doi: 10.1105/tpc.104.026757.
- Young, M. E., Cooper, J. A. and Bridgman, P. C. (2004) 'Yeast actin patches are networks of branched actin filaments', *Journal of Cell Biology*, 166(5), pp. 629–635. doi: 10.1083/jcb.200404159.
- Žárský, V. *et al.* (2020) 'Three subfamilies of exocyst EXO70 family subunits in land plants: Early divergence and ongoing functional specialization', *Journal of Experimental Botany*, 71(1), pp. 49–62. doi: 10.1093/jxb/erz423.
- Zhang, Y. *et al.* (2016) 'Golgi-localized STELLO proteins regulate the assembly and trafficking of cellulose synthase complexes in Arabidopsis', *Nature Communications*, 7. doi: 10.1038/ncomms11656.
- Zhou, K., Sumigray, K. D. and Lechler, T. (2015) 'The Arp2/3 complex has essential roles in vesicle

trafficking and transcytosis in the mammalian small intestine', *Molecular Biology of the Cell*, 26(11), pp. 1995–2004. doi: 10.1091/mbc.E14-10-1481.

Zicha, D. *et al.* (1998) 'Chemotaxis of macrophages is abolished in the Wiskott-Aldrich syndrome', *British Journal of Haematology*, 101(4), pp. 659–665. doi: 10.1046/j.1365-2141.1998.00767.x.

Zuo, X. *et al.* (2006) 'Exo70 interacts with the Arp2/3 complex and regulates cell migration', *Nature Cell Biology*, 8(12), pp. 1383–1388. doi: 10.1038/ncb1505.